

С.Н. ПЛЕСКОВА

# АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

## В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ



ДОЛГОПРУДНЫЙ  
2011

**С.Н. Плескова**

Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях: Учебное пособие / С.Н. Плескова — Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2011. — 184 с.

ISBN 978-5-91559-108-9

В учебном пособии рассмотрены не только устройство и принципы работы сканирующего зондового микроскопа, но и вопросы исследования биологических объектов, в частности нуклеиновых кислот, белков и белок-мембранных комплексов, бактериальных клеток и субклеточных структур. Книга представляет безусловный интерес, поскольку автор излагает результаты собственных исследований, в том числе технические проблемы, возникающие при исследовании биологических объектов.

При изучении биологических образцов принципиальным вопросом является наблюдение в физиологических средах, где сохраняется нативность клеток и тканей. Метод АСМ предоставляет возможность исследования живых клеток без фиксации, при этом с высоким разрешением. Основываясь на опыте работы, в книге суммируются разработанные методические подходы и полученные результаты по изучению эукариотических клеток в оптимальной для них среде.

Книга не имеет аналогов в научной и учебной литературе на русском языке.

Для научных работников, студентов и преподавателей биологических и физико-химических специальностей.

ISBN 978-5-91559-108-9

© 2011, С.Н. Плескова

© 2011, ООО «Издательский Дом  
«Интеллект», оригинал-макет,  
печать

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	6
----------------	---

## Глава 1

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ .....	9
--	---

1.1. Механические элементы атомно-силового микроскопа .....	10
1.2. Оптическая система атомно-силового микроскопа .....	14
1.3. Система обратной связи и корректировки сигнала .....	15
1.4. Режимы (моды) сканирования объектов .....	17
1.4.1. Контактный режим сканирования .....	18
1.4.2. Колебательный (резонансный) режим сканирования .....	23
1.4.3. Режим фазового контраста .....	27
1.5. Формирование АСМ-изображений .....	29
1.6. Особенности сканирования в жидкости .....	30

## Глава 2

ОСОБЕННОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ .....	36
--	----

2.1. Выбор подложки и фиксация образца .....	40
2.2. Иммобилизация нуклеиновых кислот .....	42
2.3. Иммобилизация белковых молекул .....	45
2.4. Фиксация клеток для сканирования в воздушной среде и иммобилизация для исследования в жидкости .....	50
2.5. Выбор зондов для сканирования медико-биологических объектов .....	56

**Глава 3****ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВИРУСОВ  
МЕТОДОМ АСМ .....**

3.1. Исследование ДНК .....

3.2. Исследование вирусов .....

**Глава 4****АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ  
ПРОКАРИОТ, НИЗШИХ ЭУКАРИОТ, БЕЛКОВ  
И НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ .....**

4.1. Исследование микроорганизмов .....

4.2. АСМ-исследование белков и надмолекулярных  
комплексов .....**Глава 5****АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ  
КЛЕТОК МАКРООРГАНИЗМОВ .....**5.1. Исследование фиксированных эукариотических клеток  
и тканей .....5.2. Исследование нативных эукариотических клеток  
и тканей .....5.3. FS-спектроскопия и определение ригидности живых  
клеток .....**Глава 6****ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА АСМ  
В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ .....**

6.1. Исследование специфических бактериальных белков .....

6.2. Перфорация клеток и использование зондов в качестве  
наноигл .....

6.3. Конструктивная модификация зонда .....

6.4. Высокоскоростная АСМ-микроскопия .....





## Приложение

**ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АСМ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЯХ** .....

165

**Заключение** .....

172

**Список источников, использованных при подготовке книги  
и рекомендуемых для углубленного изучения предмета** .....

173

## ВВЕДЕНИЕ

Конец XX, начало XXI веков ознаменовались появлением нового направления науки — нанотехнологии. Качественное отличие современной нанотехнологии от тех исследований, которые ранее проводились на молекулярном и атомарном уровне, заключается в том, что сейчас приборная база позволяет не только рассматривать невидимый ( $10^{-9}$  м!) мир, но и достаточно свободно преобразовывать его. Уникальным методом, позволяющим передвигать атомы по поверхности, является сканирующая зондовая микроскопия. Использовать сканирующий туннельный микроскоп для написания аббревиатур своих лабораторий отдельными атомами (например, золота) на поверхности стало одной из любимых забав ученых. Но если можно двигать атомы по поверхности, то значит можно достаточно свободно манипулировать с молекулами веществ, создавая принципиально новые, не ведомые природе конструкции.

Будет ли это иметь какое-то значение для наук о жизни? Безусловно. «Новейшая история» биологии приводит немало примеров, когда прорывные направления физики, химии, технологии позволяли открывать двери ранее закрытые для биологов-исследователей. Неоспорима и практическая значимость нанотехнологии. Уже сейчас «игры с отдельными молекулами» привели к созданию наночипов, с использованием которых проводится диагностика в считанные минуты у постели больного. Удивительно точные системы доставки, которые строго определяют клетку-мишень и именно в нее вносят лекарственное вещество, позволяют избавлять больного человека от негативных последствий химиотерапии. Нанозонды используются для экологической диагностики загрязненных и неблагоприятных зон. И сам уровень познания живой материи принципиально изменился.

В предложенной вашему вниманию книге приводятся сведения об использовании одного из основных инструментов нанотехноло-



гии — атомно-силового микроскопа. Именно атомно-силовая микроскопия позволила, наконец, не теряя высокого разрешения, исследовать биологические структуры (молекулы, клетки, ткани) в естественной для них жидкой среде. До этого у микроскопических методов были только две альтернативы:

- 1) фиксировать (убить) вирус, бактерию, эукариотическую клетку, но при этом сохранить высокое разрешение;
- 2) наблюдать за живой клеткой в буфере, но разрешение падало так сильно, что наблюдение за большинством физиологических процессов было затруднено.

Наблюдение за вирусами и тем более биологическими молекулами становилось просто невозможным.

Книга рекомендуется для студентов всех естественнонаучных специальностей, научных сотрудников, работающих в области микроскопии, физики, химии, биологии, медицины, и всех интересующихся современным состоянием науки. Использование атомно-силовой микроскопии в области биологических и медицинских исследований требует объединенных усилий и междисциплинарных связей. Физики и технологи совместно решают проблемы технического обеспечения и корректной модификации прибора в случае постановки принципиально новых задач. Программисты разрабатывают программное обеспечение для интерпретации получаемого результата. Биологи ставят задачи, готовят образцы, обдумывают новые подходы к использованию атомно-силовой микроскопии. Химики помогают с иммобилизацией органических молекул на поверхности зонда и подложки. Медики применяют результаты исследований в практических целях.

В первой главе приводятся краткие сведения о принципах работы атомно-силового микроскопа, рассматриваются основные узлы прибора. Делается акцент на принципиальном для биологии моменте — работе в жидкости. Поскольку детальное рассмотрение метода не является центральной задачей этой книги, то для более подробного ознакомления с физическими принципами работы прибора можно порекомендовать книгу В.Л. Миронова «Основы сканирующей зондовой микроскопии». Во второй главе обсуждаются особенности работы с биологическими объектами. Здесь суммируются и литературные сведения об особенностях подготовки, иммобилизации биологических объектов, о необходимости тщательного подбора зондов, режимов сканирования и излагаются собственные экс-



периментальные подходы автора, наработанные за 10 лет. Некоторые интересные моменты, связанные с пробоподготовкой, можно найти также в книге под редакцией И.В. Яминского «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров». Поскольку за последние 20 лет количество работ, посвященных использованию метода атомно-силовой микроскопии в биомедицинских исследованиях, колоссально, то рассмотрение результатов всех этих работ было бы непосильной задачей. Поэтому в последующих главах коротко рассматриваются принципиально новые для биологии и медицины результаты, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии. В последней главе перечисляются все направления, которые, на мой взгляд, являются самыми перспективными, и в ближайшем будущем будут активно развиваться и использоваться.

Поскольку книга писалась в рекордно короткие сроки, возможно, она не свободна от некоторых неточностей. Буду признательна всем, высказавшим критические замечания. Хотелось бы поблагодарить Ю.Ю. Гушину, с которой меня связывало многолетнее и плодотворное сотрудничество в области АСМ-микроскопии. В обсуждении некоторых моментов работы для меня были особенно ценными замечания и предложения, высказанные кандидатом физико-математических наук Д.Е. Николичевым, С.Ю. Зубковым. В консультациях по вопросам особенностей химических связей не отказывал доктор химический наук В.Р. Карташов. Большое спасибо кандидатам физико-математических наук С.А. Орлову и Е.В. Дубровину любезно согласившихся предоставить свои сканы для иллюстрации книги. Я признательна аспирантам и студентам, принявшим деятельное участие в подготовке рукописи: Э.Р. Михеевой, Е.Н. Горшковой, Е.Е. Пудовкиной. Спасибо Л.Ф. Соловейчику за вдохновение, навеянное короткими сроками сдачи рукописи. Огромная благодарность А.Н. Плесковой за проделанную корректорскую работу.

В названии «сканирующая зондовая микроскопия» объединены такие понятия, как сканирование (от англ. *scan* — пристально разглядывать, изучать), зондирование (от франц. *sonder* — исследование, разведка, промер глубины) и микроскопия (лат. *mikros* — мелкий, маленький и *skopos* — вижу). По сути, сканирующая зондовая микроскопия представляет собой набор методов, которые, используя зонд, движущийся по поверхности или над ней, дают полную картину топографии и свойств этой поверхности. Основными методами сканирующей зондовой микроскопии являются:

- атомно-силовая микроскопия (АСМ);
- сканирующая туннельная микроскопия (СТМ);
- сканирующая фрикционная микроскопия (СФМ);
- магнитно-силовая микроскопия (МСМ);
- электросиловая микроскопия (ЭСМ);
- ближнепольная сканирующая оптическая микроскопия (БСОМ).

Семейство сканирующих зондовых микроскопов значительно обогатило экспериментальную базу физики и химии, предоставляя информацию об электрических, магнитных, топографических, оптических и других свойствах поверхностей. Все поколение сканирующих зондовых микроскопов относится к высокоразрешающим микроскопическим методам. В частности, сканирующий туннельный микроскоп в вакууме позволяет получать изображение поверхности с атомарным разрешением. Но в биологии и медицине из-за специфики исследуемых объектов наибольшее распространение получили атомно-силовая и оптическая ближнепольная микроскопии. Атомно-силовая микроскопия предоставляет широкий круг возможностей для работы на воздухе, в воде, в буферных растворах с пространственным разрешением от единиц до десятков нанометров.



Ближнепольная сканирующая оптическая микроскопия дает оптические изображения с разрешением в десятки нанометров.

В названии «атомно-силовая микроскопия» закладывается основной принцип работы метода: силы межатомных взаимодействий между зондом и образцом (рис. 1.1).

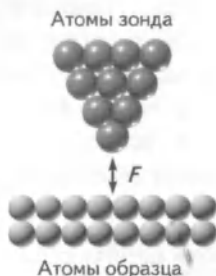


Рис. 1.1. При подведении острого конца иглы (зонда) на близкие расстояния к поверхности образца возникают силы межатомных взаимодействий ( $F$ )

Разберем основные узлы, из которых состоит атомно-силовой микроскоп. Условно конструкционные элементы атомно-силового микроскопа можно разделить на три части: механическую, оптическую и электронную систему обратной связи и корректировки сигнала.

## 1.1. МЕХАНИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Основным сенсорным элементом АСМ является кантилевер (левер, консоль, зондовый датчик). Вся информация об исследуемой поверхности получается именно благодаря отклонениям кантилевера, которые регистрируются оптической системой атомно-силового микроскопа. По сути, консоль это пружина с малой жесткостью ( $k$ ). В зависимости от материала, из которого кантилевер изготавливается, жесткость может быть выше (кремниевые кантилеверы —  $\text{SiO}_2$ ,  $k$  варьируется от 0,1 до 400 Н/м) или ниже (нитрид-кремниевые кантилеверы  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $k$  варьируется от 0,01 до 0,73 Н/м).

Общая схема атомно-силового микроскопа представлена на рис. 1.2.

Форма кантилеверов также варьируется. Они бывают V- или I-образной формы (рис. 1.3). Для биологических исследований выбирают нитрид-кремниевые кантилеверы. Форма кантилевера выбирается в зависимости от поставленных задач, но, при прочих равных условиях, в случае исследования клеток предпочтение отдается V-образным кантилеверам, поскольку степень надежности у них выше. Хотя

нужно отметить, что при равной длине у триангулярных кантилеверов жесткость, а следовательно, и резонансная частота выше.

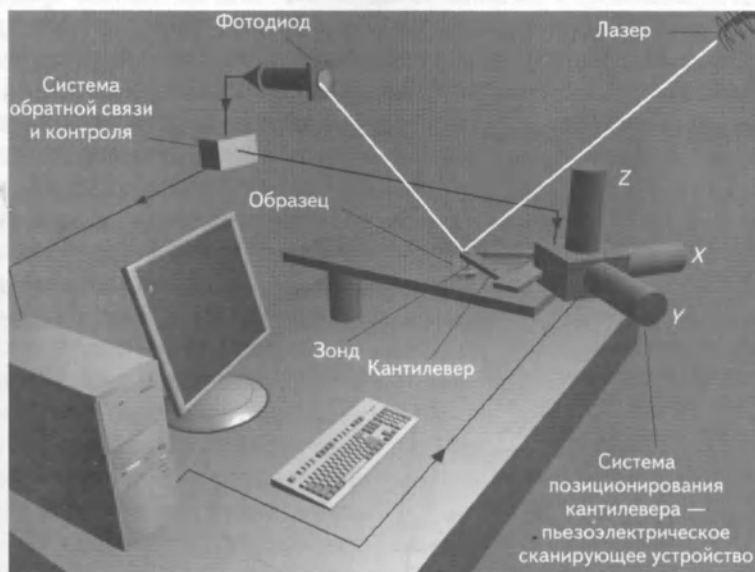


Рис. 1.2. Общая схема устройства атомно-силового микроскопа



Рис. 1.3. Виды кантилеверов

На конце кантилевера закрепляется зонд, который имеет, как правило, пирамидальную форму (хотя сейчас выпускаются зонды круглой формы, зонды с выращенной на конце острой иглой, функционализированные зонды и т. д.). При сканировании объекта зонд скользит по поверхности образца. Характер силового взаимодействия между зондом и образцом достаточно сложен, поскольку определяется свойствами зонда, образца и среды, в которой проводится ска-



нирование. В случае исследования биологических объектов на воздухе основной вклад в силовое взаимодействие зонда и образца дают: силы отталкивания, вызванные механическим контактом крайних атомов зонда и образца, силы Ван-дер-Ваальса, а также капиллярные (присасывающие) силы, связанные с наличием пленки воды и органического адсорбата на поверхности образца. Кроме того, и со стороны зонда при воздействии на достаточно мягкий образец и со стороны образца на зонд действует сила упругой деформации. Поскольку зонд движется над поверхностью, свой вклад во взаимодействие вносит сила трения. Однако большинство исследований биологических и медицинских препаратов проводится в жидкости, где нивелируются капиллярные силы, но присоединяются силы вязкого сопротивления среды, которые зависят от типа жидкости, в которой проводятся исследования.



Рис. 1.4. Схема изгиба кантилевера и регистрации взаимодействия зонда и образца с помощью оптической системы

При изменении силы взаимодействия зонда и образца кантилевер, на котором закреплен зонд, отклоняется (изгибается) и этот изгиб регистрируется с помощью оптической системы (рис. 1.4). Соотношение между силой, воздействующей на зонд со стороны образца и отклонением кантилевера, описывается законом Гука:

$$F = -kx, \quad (1.1)$$

где  $F$  — сила (Н);  $k$  — константа упругости кантилевера (Н/м);  $x$  — отклонение кантилевера.





Однако при сканировании происходит смещение зонда не только по нормали к поверхности, но и в латеральной плоскости. Все смещения регистрируются четырехсекционным фотодиодом (см. оптическая система атомно-силового микроскопа).

К механической части атомно-силового микроскопа относится также система точного позиционирования. Для перемещения зонда, закрепленного на кантилере, используются пьезокерамические двигатели, которые перемещают зонд с точностью до ангстрема. Пьезокерамические материалы изменяют свои размеры под действием приложенного к ним электрического напряжения, так, например, пьезокерамический цилиндр при приложении напряжения вдоль его оси удлиняется и становится тоньше. Это свойство и используется для перемещения зонда по одной координате, а для перемещения по трем координатам используется комбинация из трех взаимно перпендикулярных балок (трипод) (рис. 1.5).

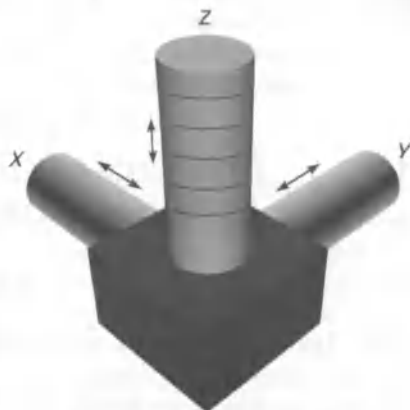


Рис. 1.5. Схема устройства триподного сканера

Однако в настоящее время большее распространение получили трубчатые сканеры. Изгибы одиночной трубки приводят к перемещению зонда по осям  $X$  и  $Y$ , а укорачивание или удлинение — по оси  $Z$ , т. е., как и в случае применения трипода, перемещение осуществляется в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Конструкции современных манипуляторов обеспечивают диапазон механического перемещения зонда до 150–200 мкм по осям  $X$  и  $Y$  и до 5–12 мкм по оси  $Z$ , т. е. в диапазон сканирования закладывается возможность исследования, как клеток, так и тканей и межклеточных контактов. Недостатком триподов является достаточно сильная асимметрия, но в отличие от трубчатого сканера он предоставляет больший диапазон сканирования по оси  $Z$ , поэтому для биологии, где высота клеток часто является ограничивающим фактором, лучше подходят именно триподные конструкции пьезоэлементов. Хотя у пьезокерамики имеются недостатки (крип и гистерезис), именно этот



тип сканирующих элементов обуславливает высокую точность позиционирования и перемещения зонда или образца. Пьезоэлемент может перемещать зонд (сканирование зондом), а может перемещать поверхность, на которую нанесен образец (сканирование образцом). Для биологических и медицинских исследований не является принципиальным вопросом, какой элемент является неподвижным, а какой — движущимся, но в любом случае требуется наличие хорошей системы виброизоляции.

## 1.2. ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Оптическая система состоит из источника когерентного излучения (лазера), луч которого фокусируется на кончик кантилевера. Луч отражается от поверхности кантилевера, выступающего в качестве зеркала, и попадает в центр четырехсекционного фотодиода. При изгибе кантилевера луч на фотодиоде смещается, что приводит к появлению тока рассогласования, который регистрируется дифференциальным усилителем и анализируется в системе обратной связи (рис. 1.6). При смещении кантилевера в нормальном направлении или при его кручении возникает разница в сигналах соответствующих участков фотодиода: верхние сегменты/нижние сегменты (при изгибе в направлении нормали) или правые сегменты/левые сегменты (при боковом кручении).

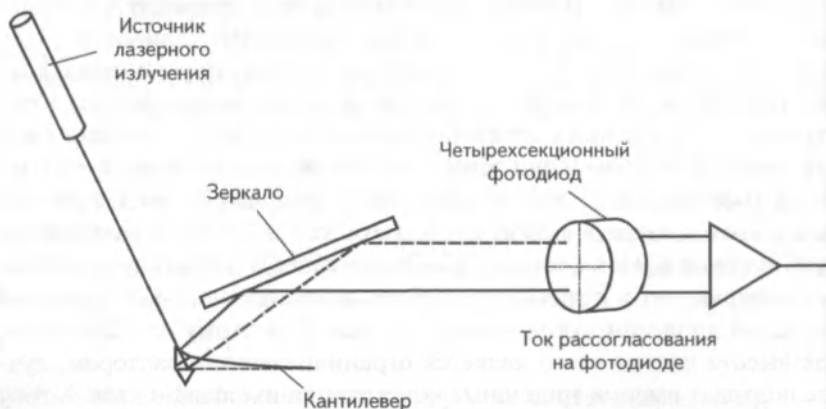


Рис. 1.6. Схема формирования тока рассогласования на фотодиоде



Первый сигнал несет информацию о балансе сил притяжения и отталкивания, а второй — о латеральных силах взаимодействия зонда и образца. В начале работы производится центровка лазера на фотодиоде, которая достигается регулировкой взаиморасположения лазера, зеркала и фотодиода.

### 1.3. СИСТЕМА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ И КОРРЕКТИРОВКИ СИГНАЛА

Цепь обратной связи в совокупности с зондом, сенсором и пьезоэлектрическим двигателем образуют механизм для позиционирования зонда, с помощью которого зонд удерживается на фиксированном расстоянии от поверхности. При большем приближении зонда к поверхности сенсорный сигнал возрастает. Компаратор сравнивает его с опорным напряжением и вырабатывает корректирующий сигнал, используемый в качестве управляющего для пьезодвигателя, который отводит зонд от образца. Изначально при настройке отражение лазера центрируется в определенной точке фотодиода. Ток рассогласования на фотодиоде (см. рис. 1.4) при изгибе кантилевера показывает, что требуется запуск системы коррекции. Система коррекции подает сигнал на пьезоэлемент до тех пор, пока изгиб кантилевера (а следовательно, и сигнал на фотодиоде) не вернется к исходному уровню (рис. 1.7).

Для поддержания какого-либо параметра (положения или частоты колебания кантилевера) равным некоторому заданному значению требуется введение трех компонент: пропорциональной, интегральной и дифференциальной. Пропорциональная компонента обеспечивает отклик системы на резкие изменения сигнала рассогласования. При корректной работе этой составляющей прописываются самые мелкие детали поверхности. Интегральная компонента контролирует отклик системы в области низких частот, т. е. отрабатывает крупные детали поверхности и компенсирует наклон образца. Дифференциальная составляющая является стабилизирующим параметром, который нивелирует осцилляции при высоких скоростях сканирования и при исследовании сложного рельефа поверхности.

При настройке атомно-силового микроскопа важно правильно задать характеристики, обеспечивающие своевременную коррекцию сигнала.

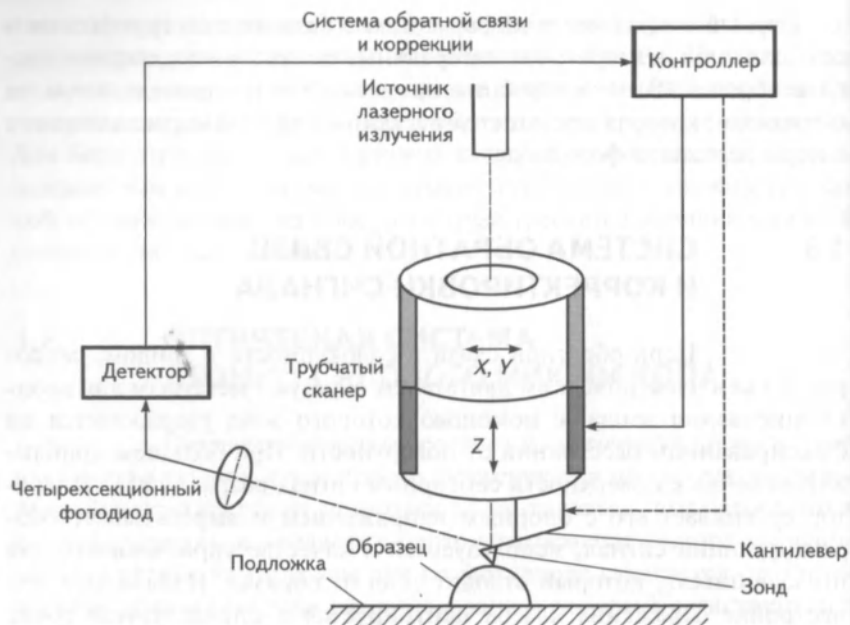


Рис. 1.7. Схематическое изображение работы системы обратной связи

Как правило, чем выше пропорциональная и интегральная компоненты, тем лучше функционирует цепь обратной связи и тем точнее прописываются черты сканируемой поверхности. Однако если они превысят некоторый критический уровень, это приведет к появлению самовозбуждения. Появление шума в случае сканирования живых клеток (особенно с малой ригидностью мембран) приводит к их разрушению (рис. 1.8).

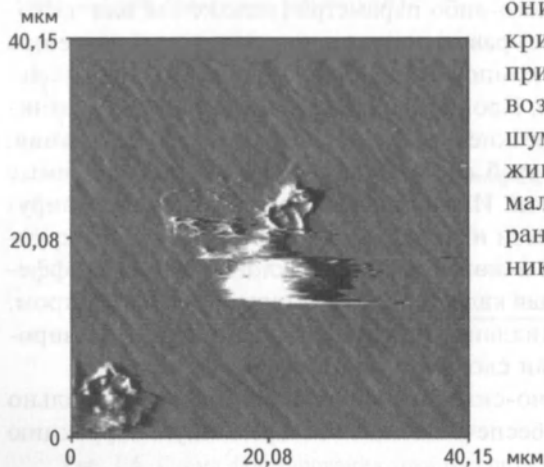
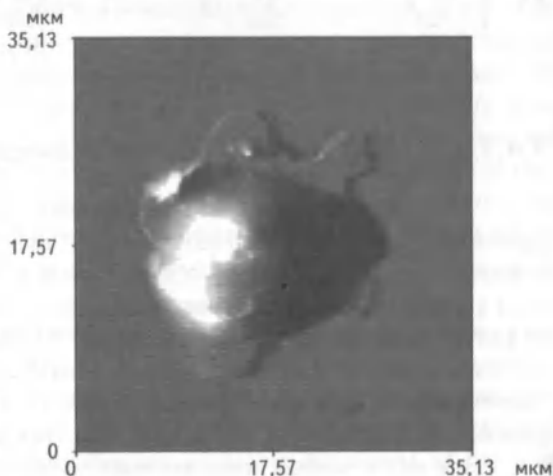


Рис. 1.8. Разрушение клетки при сканировании в результате самовозбуждения системы



При низких значениях пропорциональной и интегральной компонент система обратной связи не успевает корректировать сигнал, а значит, точность отображения топографии исследуемой поверхности будет низкой. При сканировании живых клеток иногда прибегают к этому приему, чтобы снизить воздействие зонда на поверхность исследуемой клетки. В этом случае интегральная компонента не должна быть ниже некоторого критического уровня, в противном случае зонд выйдет из обратной связи. Кроме того, снижение интегральной компоненты не дает возможности получения полноценного изображения клетки (рис. 1.9).



**Рис. 1.9.** Снижение интегральной компоненты приводит к неудовлетворительному качеству изображения клетки

Таким образом, отлаженная работа механической, оптической и управляющей систем атомно-силового микроскопа обеспечивает получение изображения любого биологического объекта с высоким пространственным разрешением.

#### 1.4. РЕЖИМЫ (МОДЫ) СКАНИРОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ

Существуют контактные и колебательные (резонансные) режимы **сканирования** (рис. 1.10).

И тот и другой методы широко используются при необходимости получения и анализа изображения в биомедицинских исследова-



ниях. Выбор режима производится исходя из поставленных практических задач.



Рис. 1.10. Зависимость силы  $F$  взаимодействия зонда и образца от расстояния  $R$  между ними

### 1.4.1. Контактный режим сканирования

Контактный режим определяется тем, что зонд непосредственно касается поверхности и повторяет ее форму по мере прохождения того или иного участка. Сумма всех сил, действующих на зонд со стороны образца, уравнивается упругой силой изогнутого кантилевера. В случае сканирования образца в контактном режиме система обратной связи и корректировки сигнала поддерживает на первоначально заданном уровне величину изгиба кантилевера. При изменении топографии поверхности изгиб кантилевера увеличится, что приводит к возникновению тока рассогласования на фотодиоде и, как следствие, возникновению напряжения в петле обратной связи. Это напряжение, подаваемое на пьезоэлемент, с одной стороны, вызовет корректировку положения зонда, а, с другой стороны, оно будет пропорционально высотному рельефу поверхности образца. Таким образом, сигнал в системе обратной связи напрямую отображает топографию исследуемой поверхности. Этот сигнал и используется для построения изображения. Еще одним вариантом получения изображения поверхности является использование режима переменной силы, но постоянного расстояния. В нем сканирование происходит при поддержании постоянной высоты между основанием зондового датчика и поверхностью, а для построения изображения используется сигнал изгиба кантилевера, который пропорционален силе, действующей на зонд со стороны поверхности. Таким образом, изображение, получаемое в режиме постоянной высоты, отражает про-



странственное распределение сил взаимодействия зонда с поверхностью. Недостатки контактного режима вытекают из самого главного условия метода: непосредственный контакт зонда и образца. Это может привести к быстрому износу или повреждению зонда. Но поскольку биологический образец является гораздо более мягким, он повреждается быстрее, что не дает получить объективную картину состояния биологического объекта. Очевидно, что при сканировании в контактном режиме биологических объектов необходимо выбирать кантилеверы с наименьшими коэффициентами жесткости.

Какие бы ограничения не накладывал контактный метод сканирования, в некоторых случаях он оказывается незаменим. Например, главный недостаток атомно-силовой микроскопии по сравнению с электронной микроскопией заключается в том, что АСМ позволяет получать изображение только поверхности клетки, а не ее внутренней структуры. Однако, если настроить прибор таким образом, что будет обеспечено сильное прижатие зонда к поверхности, в контактном режиме сканирования достаточно легко можно «прописать» цитоскелет исследуемой клетки и оценить его механическую прочность. Такая методика успешно применена к исследованию макрофагов и фибробластов.

Еще одним вариантом использования контактного режима сканирования является исследование фрикционных свойств поверхности. Для этого применяется режим регистрации латеральных сил (Lateral Force Measurement, LFM). В режиме LFM исследуются силы трения между поверхностью образца и зондом. Если в АСМ-сенсоре изображение поверхности формируется путем регистрации разностного сигнала между верхним и нижним секторами фотодетектора — отклонение по нормали к поверхности (top—bottom, T—B), то в LFM-сенсоре для получения карты распределения латеральных сил выделяется разностный сигнал левого и правого секторов фотодетектора (left—right, L—R). В процессе сканирования на зонд действует сила трения ( $F_T$ ) со стороны поверхности:

$$F_T = \mu N, \quad (1.2)$$

где  $N$  — сила реакции, действующая на зонд со стороны образца;  $\mu$  — локальный коэффициент трения.

Кантилевер испытывает деформацию кручения в вертикальной плоскости, что приводит к току рассогласования на левом и правом секторах четырехсекционного фотодиода (рис. 1.11).



Чем больше коэффициент трения  $\mu$  между зондом и участком поверхности, по которому движется зонд, тем больше изгиб кантилевера и тем больше разностный сигнал  $L-R$ . Таким образом, участки с большим коэффициентом трения на СЗМ-изображении выглядят более светлыми, а с меньшим — темными.

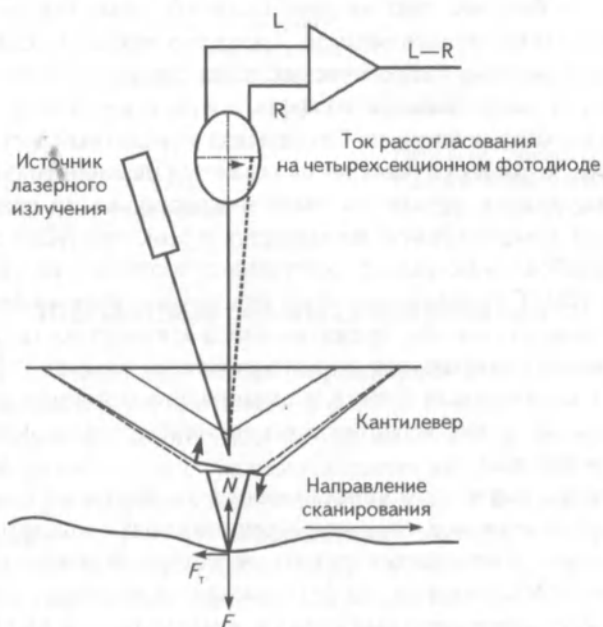


Рис. 1.11. Схематическое изображение работы режима регистрации латеральных сил

В некоторых случаях силы трения между зондом и образцом могут искажать топографический сигнал и приводить к образованию на АСМ-изображении артефактов. Для нивелирования этого нежелательного эффекта необходимо включать регистрацию LFM-сигнала, как в прямом, так и в обратном направлении сканирования. Если контраст прямого и обратного изображения будут инверсными по отношению друг к другу, значит LFM-изображение отражает истинные локальные вариации фрикционных свойств поверхности. В биологических экспериментах благодаря применению режима латеральных сил удастся получить дополнительную информацию, неочевидную при использовании только топографической моды. Например,



на рис. 1.12 показано, как благодаря применению LFM удалось выявить бактериальные клетки на шероховатой поверхности буккального эпителиоцита человека.

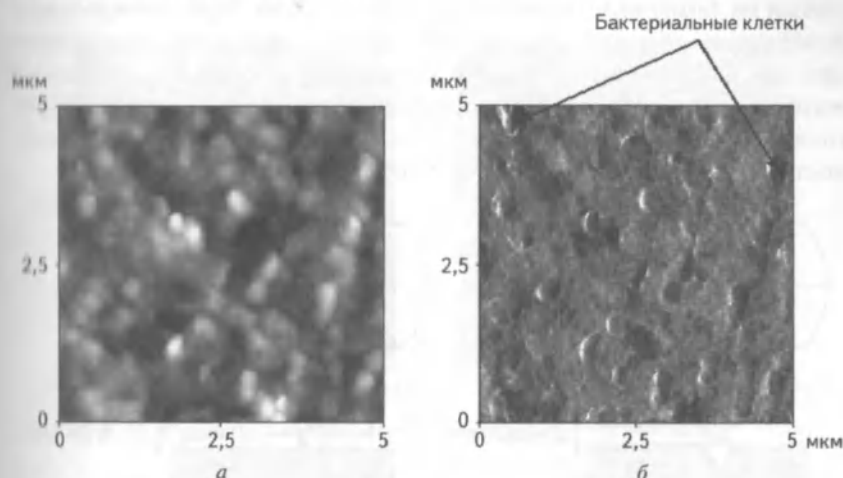


Рис. 1.12. Идентификация бактерий на поверхности буккального эпителиоцита:

*а* — изображение поверхности буккального эпителиоцита получено в контактном режиме отображения топографии; *б* — изображение получено в LFM-режиме

Еще одним полезным методом изучения поверхности в АСМ является режим исследования микротвердости образца в нанометровом масштабе — режим *Z*-модуляции. В этом режиме на ось *Z* пьезопривода (сканера) кроме постоянного напряжения, обеспечивающего перемещение зонда по вертикали и отслеживание топографии, подается переменная составляющая с частотой около 5 кГц, т. е. значительно меньшей собственной резонансной частоты кантилевера. Вследствие этого зонд совершает колебания по вертикали с небольшой амплитудой (зонд как бы тестирует поверхность на податливость).

На зонд действует переменная сила, пропорциональная упругости материала образца, приводящая к отклонению кантилевера из равновесного положения и к возникновению переменной составляющей разностного сигнала на фотодиоде в вертикальном направлении (по нормали к поверхности). Эта переменная составляющая выделяется, детектируется и подается в канал *Z*-модуляции для формирования изображения карты микротвердости поверхности. Если



поверхность образца мягкая, зонд проникает в нее без затруднений. В этом случае движение пьезокерамики по оси  $Z$  и кантилевера будут иметь примерно одинаковую амплитуду, так что разностный сигнал на фотодиоде окажется мал (рис. 1.13, а). При сканировании поверхности твердого образца, зонд будет испытывать сопротивление при внедрении в образец, и кантилевер при этом будет сильно изгибаться, что приведет к увеличению разностного сигнала на фотодиоде (рис. 1.13, б). Таким образом, изменение твердости поверхности вызовет изменение амплитуды.

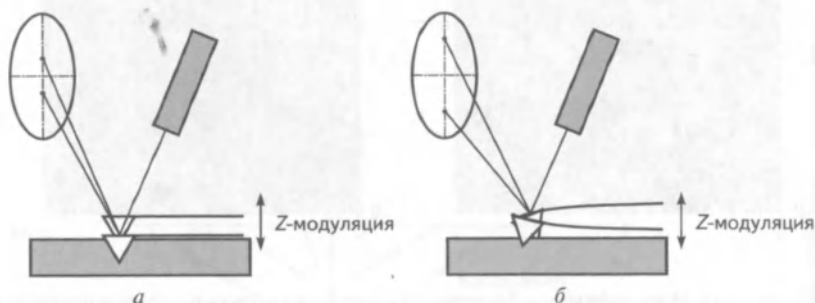


Рис. 1.13. Изменение положения кантилевера в режиме  $Z$ -модуляции:

а — проникновение в мягкий образец; б — отклонение в случае твердого образца



Рис. 1.14. Схема изменения амплитуды колебания кантилевера в зависимости от микротвердости поверхности образца

Высокой амплитуде будет соответствовать более твердая поверхность (светлые участки), а низкой амплитуде — более мягкая поверхность (темные участки). Следовательно, по карте микротвердости можно различить локальный контраст, обусловленный разным прочностным составом образца (рис. 1.14).



В качестве примера использования режима *Z*-модуляции приведем исследование распределения доменной плотности и разной текстуры в липидном бислое (рис. 1.15).

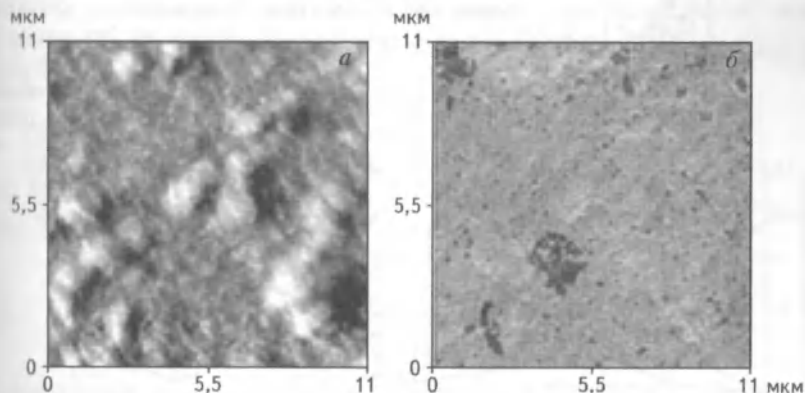


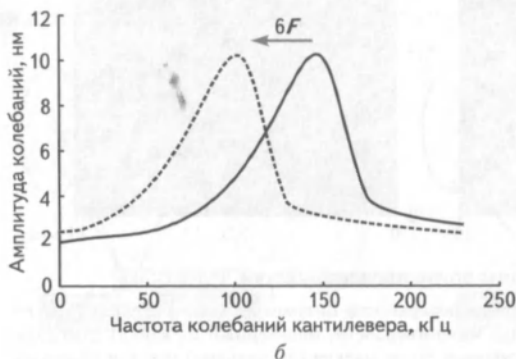
Рис. 1.15. Фрагмент мембраны эпителиальной клетки человека:

*а* — стандартный рельеф поверхности получен из канала отображения топографии; *б* — режим микротвердости, полученный из канала *Z*-модуляции, позволяет картировать более мягкие (податливые) участки поверхности и более плотные (упругие) участки, не имеющие соответствия топографическому изображению

### 1.4.2. Колебательный (резонансный) режим сканирования

В колебательном режиме сканирования кантилевер приходят в резонансные колебания, и взаимодействие с поверхностью вызывает изменение амплитуды, частоты или фазы резонансных колебаний. Для измерения силового взаимодействия зонда и образца в системе прерывистого контакта (*tapping mode*) используется резонансная схема.

На пьезокерамику накладывается переменное напряжение, которое вызывает изменение ее размеров. Частоту этого дополнительного переменного напряжения выбирают равной собственной частоте колебаний кантилевера или немного больше (обычно она находится в пределах 150—250 кГц с амплитудой 10—50 нм). В свободном состоянии зонда (вдали от образца) частота и амплитуда колебаний кантилевера поддерживаются на постоянном



**Рис. 1.16.** Градиент сил притяжения создает дополнительное напряжение на кантилевере, удерживающее его у поверхности. Это вызывает изгибание кантилевера по направлению к образцу (а) и сдвигает резонансную частоту кантилевера влево (б)



**Рис. 1.17.** Градиент сил отталкивания «отбрасывает» кантилевер от исследуемой поверхности. Это вызывает изгибание кантилевера по направлению от образца (а) и снижение резонансной частоты кантилевера со смещением вправо (б)



уровне. При приближении консоли к поверхности между зондом и образцом возникает дополнительный градиент сил, который приводит к сдвигу резонансной частоты кантилевера. Направление сдвига резонансной частоты будет зависеть от того, какие силы (притяжения или отталкивания) будут превалировать у поверхности образца (рис. 1.16, 1.17).

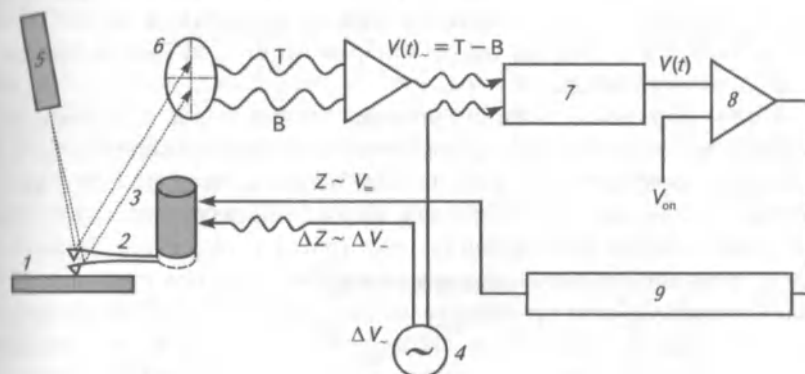


Рис. 1.18. Схема работы атомно-силового микроскопа в режиме tapping mode:

1 — зонд; 2 — кантилевер; 3 — пьезоэлемент (сканер); 4 — источник переменного напряжения, создающий вынужденные колебания системы; 5 — источник лазерного излучения; 6 — четырехсекционный фотодиод; 7 — синхронный детектор; 8 — компаратор, сравнивающий полученный сигнал с опорным; 9 — цепь обратной связи

Так как частота вынуждающих колебаний кантилевера поддерживается постоянной, то при приближении зонда к поверхности амплитуда колебаний свободного конца кантилевера уменьшается. Дополнительный вклад в демпфирование амплитуды вносят неупругие процессы при соударениях зонда и образца. Затухающая амплитуда колебаний регистрируется с помощью оптической системы и может быть определена по появлению тока рассогласования между верхними (top, T) и нижними (bottom, B) квадрантами четырехсекционного фотодиода (рис. 1.18). Далее с помощью синхронного детектора выделяется постоянный сигнал  $V(t)$ , пропорциональный амплитуде колебаний кантилевера при сканировании и согласованный с синхронным сигналом от генератора напряжений, подающегося на пьезокерамику, с тем, чтобы раскачивать



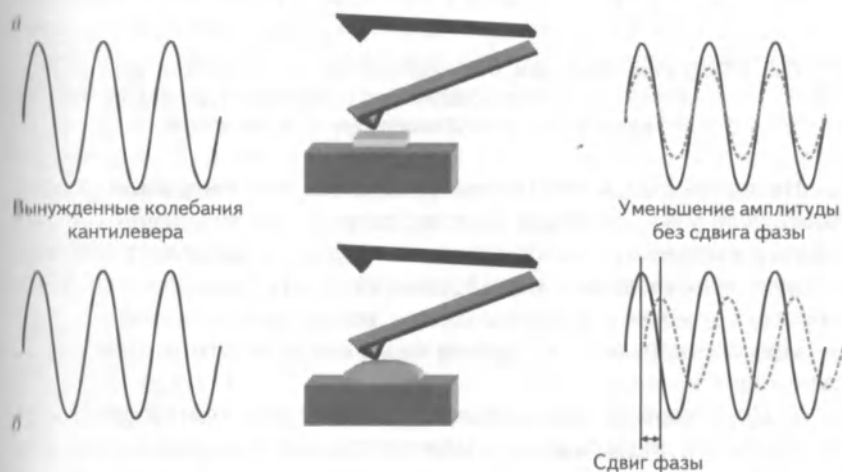
кантилевер с его резонансной частотой. Компаратор сравнивает текущий сигнал в цепи с изначально заданным  $V_{\text{оп}}$  и, при его отклонении, вырабатывает корректирующий сигнал  $V_{\text{корр}}$ . Взаимодействие зонда с образцом поддерживается постоянным за счет приближения и отвода зонда от поверхности системой обратной связи. Обратная связь отрабатывает изменение положения зонда, управляя пьезоприводом таким образом, чтобы сила между зондом и образцом была постоянной (режим постоянной силы). Сигнал о высоте  $Z$  в каждой точке изображения ( $x$ ,  $y$ ) берется из канала  $Z$ -пьезопривода.

Таким образом, для формирования изображения в колебательном режиме сканирования определяются: изменение амплитуды или изменение резонансной частоты колебаний. Детектирование амплитуды обычно используется для высокоамплитудных колебаний (нежелательно для исследования биологических объектов), тогда как детектирование резонансной частоты колебаний — при относительно малой амплитуде или при необходимости высокой чувствительности для поддержания устойчивой системы обратной связи. Желаясь подробнее ознакомиться с физическими основами формирования колебательных процессов в *tapping mode* и методами математической оценки возникающих колебаний можно порекомендовать обратиться к книге В.Л. Миронова «Основы сканирующей зондовой микроскопии» или к электронному пособию М.О. Галлямова и И.В. Яминского «Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот и тонких органических пленок».

Поскольку в колебательном режиме сканирования контакт зонда и образца минимизируется, можно использовать зонды с большим коэффициентом упругости. Однако в практике биологических исследований, как правило, слишком «жесткие» зонды не используются ни для контактных, ни для резонансных режимов сканирования. Поскольку колебательный режим сканирования позволяет существенно уменьшить воздействие зонда на образец, *tapping mode* идеален для исследования биологических и медицинских объектов, которые обладают такими «нежелательными» для АСМ-микроскопии свойствами, как чрезмерная мягкость и «липкость». Колебательный режим следует выбирать и в случае сканирования образцов с высокой твердостью, например материалов для изготовления имплантов, поскольку в данном случае снижается риск затупления и поломки зонда.

### 1.4.3. Режим фазового контраста

Одной из разновидностей резонансного режима сканирования является режим фазового контраста, который учитывает величину сдвига фаз. Если отдельные участки поверхности имеют различные свойства (упругие, адсорбционные и т. д.), то изображение будет иметь дополнительный контраст, зависящий от природы материала образца на различных участках. Он проявляется в изменении фазы колебаний зонда. При контакте с более плотным и жестким образцом происходит значительное демпфирование амплитуды колебаний зонда, но изменения фазы колебаний не происходит. В случае контакта с мягким (податливым) образцом, у которого выше адсорбционные свойства, снижается не только амплитуда колебаний зонда, но и возникает сдвиг фазы (рис. 1.19).

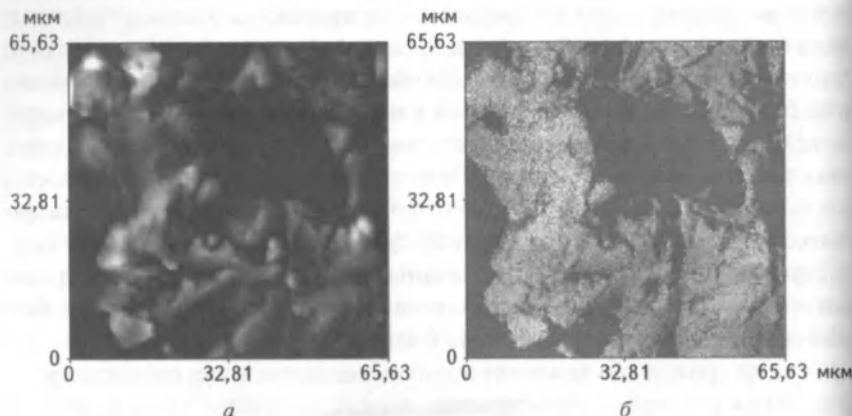


**Рис. 1.19.** При контакте зонда с жесткой поверхностью амплитуда колебаний кантилевера уменьшается, но фаза остается неизменной (а); при сканировании поверхности с высокими адсорбционными свойствами происходит не только уменьшение амплитуды вынужденных колебаний кантилевера, но и сдвиг фазы (б)

Поскольку детектирование фазы колебаний происходит одновременно с получением топографии поверхности, то из сравнения амплитудного и фазового изображения можно получить информацию о фазовом составе образца. Например, на рис. 20 представлено



изображение поверхности титанового зубного имплантата и изображение, снятое в режиме фазового контраста.



**Рис. 1.20.** Топографическое изображение участка титанового зубного имплантата (а); фазово-контрастное изображение, позволившее идентифицировать пористую структуру имплантата (б)

На картине фазового контраста заметно, что поверхность титана имеет пористую структуру. Это необходимо для врастания костной ткани в имплантат. Метод фазового контраста позволяет получать ценную дополнительную информацию о контрастных свойствах многих, в том числе и органических, материалов.

При сканировании в колебательных режимах полезно соблюдать следующие правила.

1. Использовать кантилеверы с высокой константой упругости, что позволит поддерживать стабильность системы при малой возбуждающей амплитуде.

2. Подводимое к системе напряжение не должно сильно увеличивать амплитуду колебаний зонда — в идеале амплитуда колебаний должна поддерживаться на уровне 10 нм.

3. Частота вынуждающих колебаний должна быть приблизительно на 100 Гц выше, чем резонансная частота кантилевера. Это гарантирует своевременный отклик системы на затухание амплитуды колебаний при приближении зонда к поверхности.

4. Диапазон сканирования должен быть небольшим для возможного уменьшения перепада высот на всей области сканирова-





ния. Кроме того, уменьшение диапазона сканирования предоставляет возможность снижать скорость движения зонда по поверхности, что делает систему более стабильной и позволяет идентифицировать даже минимальные детали на поверхности анализируемого объекта.

## 1.5. ФОРМИРОВАНИЕ АСМ-ИЗОБРАЖЕНИЙ

При сканировании зонд пошагово движется по исследуемой поверхности. Информация, полученная от такого прохода, хранится в виде двумерной матрицы (массива), которая может быть трансформирована как в 2D-, так и в 3D-изображение. Конечно, для биологических исследований удобнее использовать 3D-изображения. Физический смысл чисел матрицы определяется той величиной, которая оцифровывалась в процессе сканирования. Например, это величина изгиба кантилевера в контактном режиме или амплитуда колебаний в резонансном режиме и т. д. Далее производится перевод полученной матрицы в вид, удобный для восприятия. Для этого полученный массив переводят в ранги от минимального до максимального значения. Каждому значению ставится в соответствие определенный цвет радужной (видимой) палитры, т. е. высота каждой точки передается определенным цветом (или яркостью). Дополнительные преимущества дает моделирование боковой, точечной и других способов подсветки, повороты получаемого изображения на разные углы и другие варианты работы с объектом.

Программное обеспечение, разрабатываемое для атомно-силовых микроскопов, предусматривает возможность последующей коррекции получаемых изображений (например, вычитание среднего наклона поверхности, медианную фильтрацию, усреднение, повышение контрастности за счет боковой подсветки и т. д.). Кроме того, использование 3D-изображений, полученных методом АСМ, позволяет определять линейные параметры (длину, ширину, высоту) биологических объектов с высокой точностью. Подробно варианты обработки изображений можно изучить по книгам И.В. Яминского «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров» и В.Л. Миронова «Основы сканирующей зондовой микроскопии».



## 1.6. ОСОБЕННОСТИ СКАНИРОВАНИЯ В ЖИДКОСТИ

Одним из основных физических преимуществ метода атомно-силовой микроскопии является то, что она не имеет ограничений по средам, в которых можно исследовать образцы. Объекты рассматривают и в вакууме, и в воздушной среде, и в жидкости. Поскольку основным условием изучения нативной структуры белков, других органических молекул и, тем более, клеток является пребывание в физиологических растворах, то атомно-силовая микроскопия является практически единственным методом, который при сохранении высокой степени пространственного разрешения предоставляет такую возможность. Взаимодействие между зондом и образцом в воздушной среде определяется в основном следующими близкодействующими силами.

1. Основной вклад во взаимодействие зонда и образца вносят ван-дер-ваальсовы силы трех типов:

- постоянное диполь-дипольное притяжение;
- силы притяжения в системе «постоянный диполь—индуцированный диполь»;
- взаимодействие между мгновенным диполем и индуцированным диполем, которое называется также дисперсионным притяжением, или лондоновскими силами;

2. Большое влияние на взаимодействие оказывают свойства сканируемой поверхности. В частности, если и поверхность, и зонд неполярны, то между ними возникают силы гидрофобного взаимодействия, которые уменьшаются с увеличением расстояния «зонд—образец».

3. Биологические поверхности, как и многие другие, на воздухе покрыты тонкой пленкой адсорбированной на поверхности воды. Это обуславливает возникновение менисковых или капиллярных «удерживающих» сил.

4. В случае если и зонд, и поверхность заряжены, между ними могут возникать истинные ионные взаимодействия.

Характер и силу взаимодействий между зондом и образцом можно изменять, а поскольку изменять биологический образец нецелесообразно, то изменяют геометрию и химический состав зонда. Например, можно менять угол при вершине зонда, изменять его длину, формировать дополнительные покрытия и т. д.



При сканировании в жидкости, особенно в солевых растворах, характер взаимодействия зонда и образца существенно изменяется. В частности, полностью снимается влияние капиллярных сил, а выбор резонансных режимов сканирования минимизирует и действие латеральных сил. С этой точки зрения воздействие на биологический образец является более щадящим.

1. На первый план выходят водородные связи, возникающие между атомом водорода и любым электроотрицательным атомом. В случае исследования биологических объектов в качестве электроотрицательных элементов фигурируют, в основном, кислород, азот и сера.

2. Поскольку для поддержания нативности структуры сканирование обычно проводится в растворах (в простейшем случае в 0,9 % NaCl), большое значение приобретают силы ионного взаимодействия.

3. Влияние на гидродинамическую систему оказывают: вязкое смачивание и компрессия. Вязкое смачивание увеличивает эффективную массу зонда, что отражается на характере резонансных колебаний: частота колебаний уменьшается, а резонансный пик уширится. Все это отрицательно сказывается на добротности резонансного контура ( $Q$ ), который рассчитывается из соотношения:

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\Omega}, \quad (1.3)$$

где  $Q$  — добротность резонансного контура;  $\omega_0$  — резонансная частота;  $\Delta\Omega$  — ширина резонансного пика.

Поскольку  $\omega_0$  в жидкости значительно уменьшается, а  $\Delta\Omega$ , напротив, возрастает, то очевидно, что добротность резонансного контура, которая отвечает за чувствительность системы и скорость ответа обратной связи, существенно снижается. Действительно, если для сканирования в воздушной среде  $Q$  составляет порядка 100, то в жидкости  $Q$  падает до 2—3. Критичное снижение добротности резонансного контура приводит к тому, что система обратной связи не успевает обрабатывать сигнал и проводить своевременную коррекцию колебаний. Результатом такого запаздывания может являться разрушение клеток или других биологических образцов. При дальнейшем снижении  $Q$  повреждается и зонд.

Возникновение компрессионных/отталкивающих сил обусловлено другим явлением. Как правило, радиус закругления вершины зонда при исследовании живых клеток должен быть достаточно большим. При движении зонда к поверхности клетки он начинает сжи-



мать жидкость на локальном участке поверхности между зондом и клеткой, однако жидкости плохо сжимаемы, поэтому на зонд начинают действовать отталкивающие силы (рис. 1.21, 1.22).

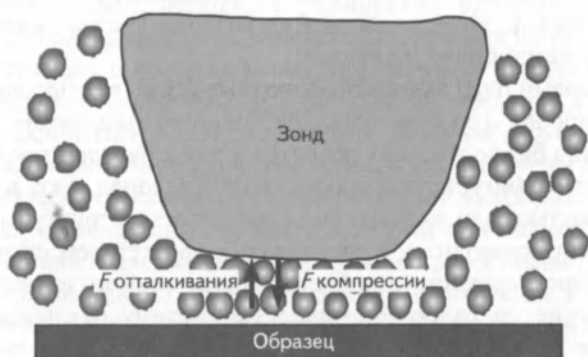


Рис. 1.21. Погружение зонда в жидкость должно быть достаточно медленным, чтобы снизить силу компрессии (сжатия) жидкости между поверхностью зонда и образца. При нарастании компрессии сила отталкивания со стороны жидкости также возрастает, внося коррективы во взаимодействие зонда и образца



Рис. 1.22. Кривая силы демонстрирует резкое возрастание вязкости жидкости при приближении зонда к образцу

Дополнительные проблемы создают резонансные режимы сканирования, поскольку колебания зонда вызывают появление нежелательных акустических волн между зондом и поверхностью биологического объекта. Дело в том, что упругая клетка отражает волны, которые приходят на нее из-за колебаний кантилевера, в то же время зонд, приближаясь к поверхности клетки, изменяет амплитудно-частотные характеристики колебаний кантилевера. Поэтому волны,



отраженные от клетки, и волны, образующиеся от колебаний кантилевера на новой частоте, накладываются. Это порождает новые нежелательные возбуждения в регистрирующей системе, снижающие ее чувствительность при приближении к образцу.

Поскольку наблюдения за биологическими объектами ведутся в условиях, обеспечивающих максимальную сохранность белков или клеток, то температура в термостатируемой ячейке особенно при длительных наблюдениях поддерживается на уровне 37 °С. Но подъем температуры вызывает появление температурных флуктуаций, которые вносят дополнительный шум в систему, рассогласовывая основной сигнал.

4. Неровности биологических поверхностей вызывают асимметрию жидкости, которая отражается на взаимодействии в системе «зонд—жидкость—биологический объект» и может вызвать появление артефактов. Определенную коррекцию вносит и размер молекул жидкости. Например, резонансная частота кантилевера значительно смещается при переносе наблюдений из воды в водно-спиртовой раствор.

Обычно с целью сохранности биологических проб их исследование в жидкости проводится с использованием колебательных режимов сканирования. Но в то же время сканирование в жидкости сопряжено с появлением дополнительных трудностей. В частности, возникают нежелательные дополнительные вибрации, которые вносят возмущения в стационарные колебания кантилевера. Жидкость оказывает сопротивление колебаниям кантилевера, так как это гораздо более вязкая среда, чем воздух. Колебательная система становится более чувствительной к внешним воздействиям из-за резкого снижения добротности резонансного контура ( $Q$ ).

При исследовании в воздушной среде выбираются кантилеверы, дающие при колебаниях узкий (острый) резонансный пик. Это подразумевает  $Q$ , следствием чего является увеличение чувствительности системы и уменьшение силы взаимодействия с образцом. Однако в жидкости, из-за значительного увеличения вязкости среды и сопротивления колебаниям кантилевера чувствительность системы существенно снижается, а колебания кантилевера становятся нестабильными. Одним из вариантов преодоления этой проблемы является добавление в систему обратной связи дополнительного  $Q$ -контроллера, который отслеживает сдвиг фазы вынужденных колебаний кантилевера, усиливает сигнал расхождения фаз и подает корректирующую



щее напряжение на осциллятор для возвращения фазы колебаний пьезоэлемента к исходному уровню. Конструкция  $Q$ -контроллера предусматривает, что первоначальная коррекция фазы колебаний происходит, когда зонд не взаимодействует с поверхностью. При сканировании в рабочем режиме сдвиг фаз с одновременным уменьшением амплитуды колебаний наблюдается вблизи поверхности образца, сигнал считается полезным и не корректируется в системе обратной связи. Осцилляция кантилевера в жидкости обычно порождает появление в колебательном спектре дополнительных (ложных) пиков, которые иногда столь выражены, что маскируют истинный резонансный пик. В этом случае применение  $Q$ -контроллера помогает дифференцировать спектр и выбрать истинный резонансный пик. Однако  $Q$ -контроллер применяется только в том случае, если детектируется амплитуда колебаний. Если в качестве опорного сигнала выбирается изменение частоты колебаний, то применяется другое контролирующее устройство — узкополосный детектор, использующий высокостабильную параметрическую петлю обратной связи. В нем изменение частоты осцилляции детектируется как изменение фазы осцилляции, а далее узкополосный детектор работает как стандартный  $Q$ -контроллер.

Таким образом, даже работая в жидкости, можно получать изображения биологических объектов с высоким разрешением. Для сохранения качества получаемого сигнала необходимо значительно снижать амплитуду колебаний кантилевера (она должна быть меньше 1 нм) и уменьшать уровень шума сенсорного элемента (основной вклад в него вносят температурные флуктуации). Значит, коррекцию добротности можно проводить не только внося конструктивные поправки в систему обратной связи, но и изменяя механические узлы системы, например, варьируя форму и размеры кантилеверов или выбирая кварцевые сенсоры с большей массой, чем эффективная масса жидкости.

Еще одна проблема, возникающая при сканировании в жидкости, связана с тем, что при колебаниях кантилевера в жидкости индуцируются колебания самой жидкости (акустические колебания), эти волны интерферируют с собственным колебанием кантилевера, вызывая появление дополнительных резонансных пиков, снижающих общую чувствительность системы. Поэтому и сама конструкция жидкостной ячейки должна быть такой, чтобы свести к минимуму возможность «наведенных» колебаний жидкости. При скани-



ровании в жидкости в резонансных режимах биологических объектов не меньшую значимость приобретает и значительный перепад высот. Сканирование в этом случае, например, при переходе из области распластанной цитоплазмы в область ядра сопровождается появлением неустойчивости колебаний или даже приводит к полному затуханию осцилляций. Это может привести к разрушению биологического образца. Для предотвращения этого явления частоту вынужденных колебаний немного сдвигают относительно резонансной частоты кантилевера, это приводит к своевременному отклику системы обратной связи на резкий перепад высот, но в то же время качество изображения падает и некоторые самые мелкие детали оказываются не отображенными.

Однако, несмотря на все трудности и проблемы, которые вызывает наблюдение за биологическими объектами в жидкости, метод быстро перешел в разряд стандартных, и на сегодняшний момент практически нет биологических или медицинских образцов, для которых было бы введено строгое ограничение на наблюдение в физиологической среде. Сейчас разрешены проблемы, связанные даже с высокоскоростными наблюдениями за живыми объектами методом АСМ, и в ближайших планах находятся такие видоизменения методики, которые позволили бы рассматривать локальные изменения зарядов на поверхности в ходе метаболизма и при воздействии внешних факторов. Не менее интересным направлением является изучение гидрофильно/гидрофобных взаимодействий в биологических образцах.

Резюмируем основные факторы, принципиальные для получения оптимального изображения биологических объектов методом атомно-силовой микроскопии.

1. Правильный выбор режима сканирования в зависимости от поставленной задачи.
2. Конструкция пьезосканера, обеспечивающая требуемый диапазон сканирования.
3. Корректная установка параметров обратной связи для своевременной коррекции сигнала.
4. Подбор зондов с оптимальной геометрией и малым коэффициентом упругости.
5. Точное позиционирование зонда.
6. Правильная пробоподготовка.

## ГЛАВА 2

## ОСОБЕННОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В МЕДИКО-БИОЛО- ГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Основная задача, стоящая перед исследователями биологических процессов, — дать полную и объективную картину процессов, протекающих в нормальном (физиологическом) состоянии. Для решения медицинских проблем важно уметь оценить глубину патологических изменений и наметить пути коррекции этих нарушений. Современный уровень развития науки позволяет опираться на функциональные методы диагностики, рассматривать морфологические, структурные изменения отдельных клеток, надмолекулярных комплексов, белков и генов. Иногда изменение морфологии само по себе является достаточно информативным критерием и позволяет диагностировать целый ряд заболеваний: серповидно-клеточную анемию, талассемию, прионные инфекции, целый ряд злокачественных новообразований и т. д. Развитие биологии ознаменовалось появлением множества методов, которые позволяют судить о состоянии тканей и органов на основе косвенных показателей, а также по оценке клеточной физиологии.

Задачей, которая никогда не теряла своей актуальности, являлось получение изображения клеток и отдельных органических молекул с высоким разрешением. Это позволяло судить о стандартных размерах, наличии или отсутствии отдельных внутриклеточных структур, а также определять изменения, возникающие при патологических сдвигах. Несомненно, центральная роль здесь принадлежит микроскопии. Световая оптическая микроскопия сейчас находится на вооружении микробиологических и гистологических лабораторий, позволяя проводить не только экспресс-диагностику заболеваний, но и оценивать активность клеток (процессы пролиферации, апоптоза, злокачественной трансформации). Однако световая микроскопия оказывается бессильной при необходимости учитывать тонкие





структурно-функциональные перестройки клеток, возникающие при физиологических и патологических процессах, т. е. являясь вполне приемлемым методом лабораторной диагностики, она не удовлетворяет современным требованиям научного исследования. Еще одно ограничение в применении оптических микроскопов связано с тем, что фокусирование светового пучка на единичной клетке может вызвать явление световой цитотоксичности. Особенно ярко это явление продемонстрировано при использовании водной или масляной иммерсии, при погружении нагретого объектива и его касания поверхности клетки.

Электронная микроскопия и рентгеновская кристаллография предоставили сведения о структуре мембран клеток, строении вирионов и особенностях нуклеиновых кислот. Весомым преимуществом этих методов является возможность проводить детальный анализ биообъектов, а недостатком — сравнительная сложность приготовления препаратов, в процессе чего изначальная структура может быть значительно изменена. Например, обработка четырехокисью осмия приводит к значительной потере белка из мембраны эритроцитов. Метод «замораживания—скалывания» и другие матричные методы позволяют получать только одномоментные изображения, т. е. их использование не предполагает динамического наблюдения за биологическими объектами. Для того чтобы обойти эту сложность и исследовать витальные образцы, в настоящее время используются методы ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, рентгеновской дифракции. Однако каждый из этих методов имеет те или иные ограничения. Применение ЯМР затруднено, так как для получения пригодных для исследования малых везикул или мембранных фрагментов необходима предварительная фрагментация с помощью ультразвука. Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния света основана на измерении разности энергии фотонов падающего света и света, рассеянного за счет колебательных движений фононов в образце. Тип колебаний, их интенсивность сильно зависят от физического состояния молекул. Колебания часто охватывают всю молекулу, поэтому количественная интерпретация спектров является нетривиальной задачей. А в том случае, если в мембрану включены хромофоры или флуоресцирующие примеси, этот метод становится вовсе непригодным (флуоресценция создает слишком сильный шум, а хромофоры сильно поглощают лазерное излучение и нагревают



образец). Для изучения мембран с помощью рентгеновской дифракции молекулы должны находиться в высокоупорядоченной форме, что в свою очередь диктует ограничения метода. При использовании большинства из перечисленных методик клетки приходится разрушать для того, чтобы выделить ту или иную структуру (мембраны, отдельные органеллы и т. д.), что дает возможность детального изучения выделенной структуры, но при этом теряется возможность целостного исследования. Конечно, для получения комплексных выводов о строении или функционировании любое исследование сейчас строится на сочетании самых разных методик. В этом случае каждая из них является своеобразным «пазлом», и когда каждый пазл встает на свое место, можно получить совокупную картину процессов, происходящих в клетке.

Все методы, перечисленные выше, требуют тщательной предварительной обработки материала, что приводит к частичной или полной деформации начальной структуры биологических молекул. Это отражается как на качестве проводимых исследований, так и на выводах о функциональной активности клеточных структур. Поэтому любой исследователь заинтересован в появлении неразрушающих методик, позволяющих получить представление о морфологии клетки и функционировании биологических молекул в их нативном состоянии. Таким методом стала атомно-силовая микроскопия. Она предоставила возможность получать изображения молекул, вирусов, клеток с высоким разрешением, в физиологичной среде и позволила проводить различные манипуляции с объектами исследования. Воздействуя различными веществами на клетку, механически изменяя конфигурацию белков, наблюдая межклеточные взаимодействия, можно добиться визуализации происходящих при этом изменений, что позволяет значительно расширить поле эксперимента. Наблюдение за живыми клетками и отдельными биологическими молекулами можно проводить и с помощью световой (фазово-контрастной, интерференционной) микроскопии и с помощью конфокальной и многофотонной микроскопии, но разрешающая способность атомно-силовой микроскопии на несколько порядков выше самых современных оптических микроскопов.

Одним из существенных преимуществ метода является исследование биологических объектов в режиме реального времени, что позволяет даже снимать микрофильмы о некоторых процессах, на-



пример гибридизации двух комплементарных молекул ДНК, открытия и закрывания высокоселективных ионных каналов. При этом получают трехмерные изображения, точно определяют латеральные размеры объектов и шероховатость поверхности.

Даже изучение фиксированных препаратов в воздушной среде позволяет отказаться от использования жестких методов фиксации (в отличие от электронной микроскопии) и тем самым минимально травмировать клетки или изменить конформацию биологических молекул. Экономически выгодным является исключение трудоемких и дорогостоящих процедур контрастирования и фиксации образца, при этом не теряется качество изображения.

Метод атомно-силовой микроскопии предоставляет уникальную возможность определения вязко-упругих свойств и адгезивных характеристик биомолекул — в перспективе с разработкой новых дополнительных модификаций метода можно будет определять локальный потенциал клеточных мембран. Быстро развивающаяся область применения АСМ для исследования биологических образцов охватывает области от изучения отдельных молекул ДНК, белков, липидных моно- и бислоев до получения информации о структурной организации целых клеток.

Таким образом, основными преимуществами метода атомно-силовой микроскопии в исследовании биологических и медицинских объектов являются:

- высокое разрешение (ангстремное в вакууме и на воздухе, нанометровое — в жидкости);
- простота пробоподготовки при исследованиях в воздушной среде;
- определение морфометрических параметров биологических объектов (длины, ширины, высоты) с высокой точностью;
- исследование биологических и медицинских объектов в нативной для них среде (в растворах);
- длительное динамическое наблюдение за поведением единичной молекулы или отдельной клетки;
- модификация среды, в которой производится наблюдение, с регистрацией немедленного отклика на эти изменения;
- возможность проведения механических манипуляций на нанометровом уровне: получение отдельных молекул из клеток или их введение в клетку, распрямление белка (unfolding) с определением его механической прочности, разрезание ДНК и т. д.;



- исследование вязко-упругих, зарядовых, фрикционных, гидрофобных свойств биологических объектов и построение карт их распределения на поверхности клеток;
- оценка прочности адгезионных контактов между прокариотической и эукариотической клеткой, между клеткой и вирусом, между двумя однотипными клетками;
- применение метода в качестве конструкционного для изготовления различного рода сенсорных панелей для медицинской диагностики.

Уже с появлением в 1990-х годах многочисленных работ, доказывающих успешное использование АСМ в исследованиях биологических объектов, были выявлены и значительные методические и технические проблемы. Несмотря на огромное количество преимуществ, атомно-силовая микроскопия, как и любой другой метод, не идеальна. Некоторые ограничения метода являются непреодолимыми. Например, в отличие от электронной, атомно-силовая микроскопия не позволяет рассматривать внутреннюю структуру клеток. Это ограничение пытаются преодолевать двумя способами: во-первых, фракционируя отдельные органеллы клеток (митохондрии, хлоропласты), высаживая на подложку и сканируя их, во-вторых, для исследования цитоскелета зонд плотно прижимается к поверхности клетки и мембрана «продавливается» под ним, позволяя выявлять некоторые внутренние структуры клеток. Естественно, нативность структур в обоих случаях теряется. Поскольку это ограничение является следствием конструкции и принципа работы атомно-силового микроскопа — сканирование поверхности, — то и сам метод для исследования внутренних структур является неадекватным. Остановимся подробнее на основных проблемах, возникающих при исследовании биологических образцов методом АСМ, которые могут быть достаточно легко решены.

## 2.1. ВЫБОР ПОДЛОЖКИ И ФИКСАЦИЯ ОБРАЗЦА

Можно сформулировать требования к подложкам, применяемым в атомно-силовой микроскопии для изучения биологических и медицинских образцов: гладкость и ровность поверхности; биоинертность, т. е. подложка не должна влиять на структуру (конформацию) и функции наносимого на нее объекта; адаптируемость



к иммобилизации биологических объектов. Для исследования биологических молекул ДНК, липидного бислоя, интегральных и свободных белков, для изучения вирусов лучше всего подходят ровные подложки, как, например, атомарно-гладкие сколы слюды, высокоориентированный пиролитический графит, пленки металлов и полупроводников, полученные в результате эпитаксиального роста. Во-первых, такие подложки легко подвергаются модификации, что в последующем облегчает иммобилизацию молекул, а во-вторых, гладкость поверхности, близкая к идеальной, позволяет избежать появления артефактов.

В случае работы с клеточными культурами требования к подложкам изменяются. Идеальная гладкость в данном случае будет скорее препятствовать иммобилизации. Поэтому на первый план выходит требование к прозрачности используемых подложек. Для исследования клеток, как эукариотических, так и прокариотических, удобнее всего являются стеклянные подложки, подложки на основе полистерола, поливинилхлорида и т. д. (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Примеры подложек, используемых в атомно-силовой микроскопии для иммобилизации биологических образцов:

*a* — стекло; *б* — чашка Петри (поливинилхлорид); *в* — слюда

Обычно в комплектацию лабораторных комплексов входит не только сканирующая головка атомно-силового микроскопа, но и оптический микроскоп, позволяющий позиционировать зонд на интересующую клетку. Оптический контроль немаловажен и для самого процесса сканирования (например, чтобы своевременно заметить отрыв клетки от поверхности подложки), а в случае, если микроскоп флуоресцентный, применение специальных флуоресцирующих меток дает дополнительные сведения о распределении мо-



лекул в клетке. Поэтому прозрачность подложки и является столь важной. В настоящее время атомно-силовые микроскопы, ориентированные на биологические исследования, включают в себя термостатируемую жидкостную ячейку со стеклянным дном. Удобно использовать и стандартные чашки Петри малого диаметра, позволяющие вести длительные наблюдения. Первоначально до появления специализированных микроскопов исследования проводились на стекле, в капле жидкости. Недостатки такого метода очевидны:

- испарение жидкости;
- связанное с этим явлением повышение концентрации солей в объеме, вплоть до кристаллизации;
- уход от физиологического состояния.

Не было также возможности поддержания температуры на заданном уровне — фактор критичный для долговременных наблюдений.

## 2.2. ИММОБИЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Необходимо, чтобы при сканировании биологический объект был прочно зафиксирован на поверхности подложки, поскольку при латеральном движении зонд может смещать или отрывать его. Эта проблема решается разными путями, в зависимости от выбора анализируемого объекта. Особенно актуальна проблема приготовления образца при исследовании динамических процессов. Например, при изучении динамики белково-нуклеинового взаимодействия ДНК и/или РНК должна обладать подвижностью, которая обеспечивала бы ее доступность для фермента. Молекула должна распрямляться на поверхности. В этом случае проводят закрепление ДНК на плоских поверхностях (стекло, свежесколотая слюда) за счет электростатических взаимодействий. Для этого ДНК наносят на подложку в рабочем растворе буфера (pH 7,4), а сама подложка предварительно обрабатывается катионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  или  $\text{Zr}^{4+}$ . Ионы металлов в данном случае являются своеобразными «мостиками» между отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК и отрицательно заряженной слюдой (рис. 2.2).

Предварительно проводится модификация подложки: свежесколотую слюду на несколько часов помещают в раствор, содержащий ионы металлов, затем промывают дистиллированной водой для удаления избытка катионов, после чего наносят образец из буфера.



В случае наблюдения за динамическими процессами, например, взаимодействия ДНК с гистонами буфер остается на подложке. Метод «ионных связок» в данном случае является оптимальным, поскольку, обеспечивая достаточную иммобилизацию, он не препятствует конформационным изменениям молекулы. Кроме того, он прост в исполнении и высоко воспроизводим. Исключение из процесса обработки подложки ионов приводит к дестабилизации образца (плохой иммобилизации и появлению большого количества скрученных участков). В данном методе иммобилизации большое внимание следует уделять молярности раствора солей и значениям pH буфера. При изготовлении проб ДНК для исследования в воздушной среде после высаживания образца на поверхность подложки и подсушивания проводится тщательная отмывка для удаления образовавшихся кристаллов и примесей. Чтобы сделать подложку более «чистой», промывку нужно проводить не дистиллированной водой, а водно-спиртовым составом. При исследовании ДНК и других малых молекул (но не клеток!) в растворах в некоторых случаях удается добиться лучшего разрешения, чем при изучении на воздухе. Это связано, в первую очередь, с нивелированием в жидкости влияния капиллярных сил, оказывающих достаточно сильное «присасывающее» воздействие на зонд в контактном режиме сканирования. Снизить влияние латеральных сил можно, применяя резонансные режимы сканирования.

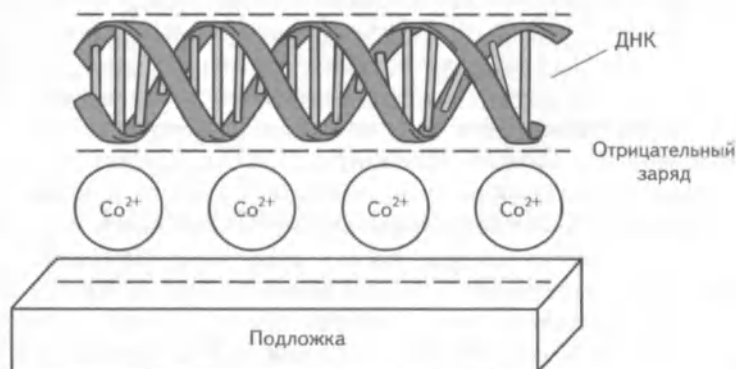


Рис. 2.2. Принцип иммобилизации ДНК на подложке с использованием катионов в качестве «мостиков»

Стабилизация молекулы ДНК ионами металлов является не единственным методом, облегчающим фиксацию. Поверхность подлож-





ки для иммобилизации ДНК на поверхности может быть силанизирована, покрыта бензилдиметилалкиламмонием, 2,4,6-трис(диметиламинометил)-фенолом или хлоридом цетилпиридиния для разворачивания молекулы ДНК на поверхности подложки. Последние три вещества являются поверхностно-активными, они формируют на подложке пленку, которая способствует сразу и стабилизации, и расправлению молекулы. Процесс силанизации слюды не изменяет топографические характеристики поверхности, зато процесс иммобилизации значительно упрощается. Силанизация предоставляет хорошие условия даже для «жесткой» отмытки, а ДНК остается стабильной в процессе сканирования. Достаточно популярным способом модификации подложки среди исследователей ДНК является покрытие 3-аминопропил-3-этоксисиланом. Аминогруппы этого соединения ковалентно связываются со слюдой. Это делает препарат чрезвычайно стабильным, а выпрямление ДНК позволяет распределять молекулы по длинам. К недостаткам такой фиксации относится «потеря подвижности» молекулы на поверхности подложки.

Дальнейшее усовершенствование методики модификации подложки и зондов для АСМ привело к формированию нового направления — химической силовой микроскопии. Этот метод предоставил дополнительные возможности: в режиме силовых измерений можно определять силы взаимодействия между молекулами, иммобилизованными на модифицированных поверхностях зонда и подложки. При желании получить долговременный препарат, который может храниться и исследоваться неоднократно, обращаются к методу «матрицы», широко используемому в электронной микроскопии. На иммобилизованную ДНК напыляется под углом 45° платина, платиновой реплике придают прочность, дополнительно нанося углерод. В дальнейшем матрица снимается и исследуется в любых условиях (вакуум, воздух, жидкость). Однако в таком методе не реализуется ни одно из преимуществ атомно-силовой микроскопии, и он может рекомендоваться только для сопоставления результатов биологических исследований на разных атомно-силовых микроскопах.

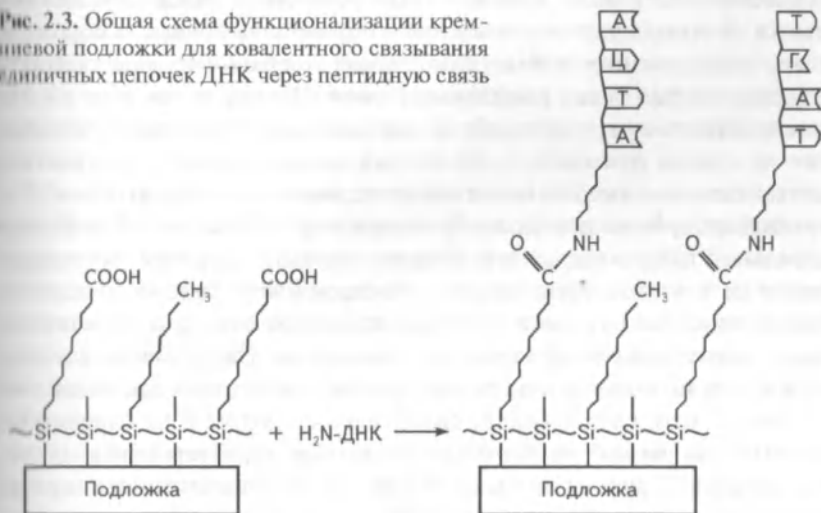
Сейчас активно развивается метод ковалентной иммобилизации нуклеиновых кислот. Ковалентное связывание хорошо тем, что позволяет конструировать сенсоры, долго работающие без десорбции нуклеиновых кислот с подложки. Одна цепочка ДНК ковалентно





связывается с подложкой, а другая фиксируется на зонде. Подводя и отводя зонд, можно учитывать количество образовавшихся комплекментарных связей между цепочками. Подложка для ковалентного связывания цепочек ДНК может быть изготовлена следующим образом: вначале поверхность кремния гидрируется и подвергается анизотропному химическому травлению в  $\text{NH}_4\text{F}$  растворе. Затем полученная поверхность функционализируется монослоем алкильных цепей, несущих на концах карбоксильные группировки ( $\text{COOH}$ ,  $\text{COOR}$ ). И наконец, к ним ковалентно привязывают amino-модифицированные единичные цепочки ДНК (рис. 2.3).

Рис. 2.3. Общая схема функционализации кремниевой подложки для ковалентного связывания единичных цепочек ДНК через пептидную связь



### 2.3. ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Для исследования белков применяются другие стратегии. В некоторых случаях для получения интегральной картины, особенно если целью является исследование процессов белок-липидных взаимодействий или необходимо исследовать функциональную активность белка, их сканирование производится непосредственно в составе мембраны. Таким образом, рассматриваются и трансмембранные, и поверхностные белки мембран. В данном случае ставится задача иммобилизации целых мембран. Одним из наи-



более ранних способов иммобилизации мембран является их растягивание с помощью игл на поверхности подложки. Одним из модельных методов работы с белками является их выделение из различных субстратов и последующее включение в состав искусственных мембран. Но, как правило, исследователи работают с отдельными белками. Техника связывания белка с подложкой может быть разной. Она определяется в первую очередь задачами исследования.

Изначально, белки пытались иммобилизовать таким широко апробированным методом, как адсорбция, т. е. нанесение белка на подложку, инкубация при заданных условиях и последующая отмывка. В этом случае отмывку нужно проводить крайне осторожно, а для исследования в воздушной среде необходимо еще обдуть фиксированный белок инертными газами. Однако метод имеет большое количество ограничений: во-первых, часть белка десорбируется уже на стадии отмывки, и, во-вторых, сканирование в жидкости в контактном режиме вызывает окончательную десорбцию белка. Для лучшей адсорбции нередко используется подложка, не обладающая идеальной гладкостью, а это, в свою очередь, затрудняет интерпретацию результатов. Негативным моментом является и то, что десорбированный белок, имеющий определенный заряд, связывается с заряженным зондом, изменяя его геометрию. Ситуация не улучшается и при использовании резонансного режима сканирования, поскольку в этом случае белок, связываясь с зондом и кантилевером, значительно меняет амплитудно-частотные характеристики системы, затрудняя работу петли обратной связи и прерывая сканирование. В то же время высушивание образца и сканирование в воздушной среде не представляет большого интереса для исследования белка. Иногда убедительных результатов физической адсорбции белка удается добиться на поверхности некоторых металлов (золото, титан и т. д.). Физическая адсорбция оказывается оправданной при исследовании фибриллярных, но не глобулярных белков. Тем не менее даже плохая адсорбция белка может достаточно остроумно использоваться в практических целях. Например, стерилизация — одна из главных задач медицины — предусматривает не только уничтожение всех вегетативных и споровых форм микроорганизмов, но и, в идеале, избавление всех поверхностей от связавшихся на них органических молекул. Белки, например токсины или вируспецифические протеины, компоненты биопленок могут адсорбироваться на

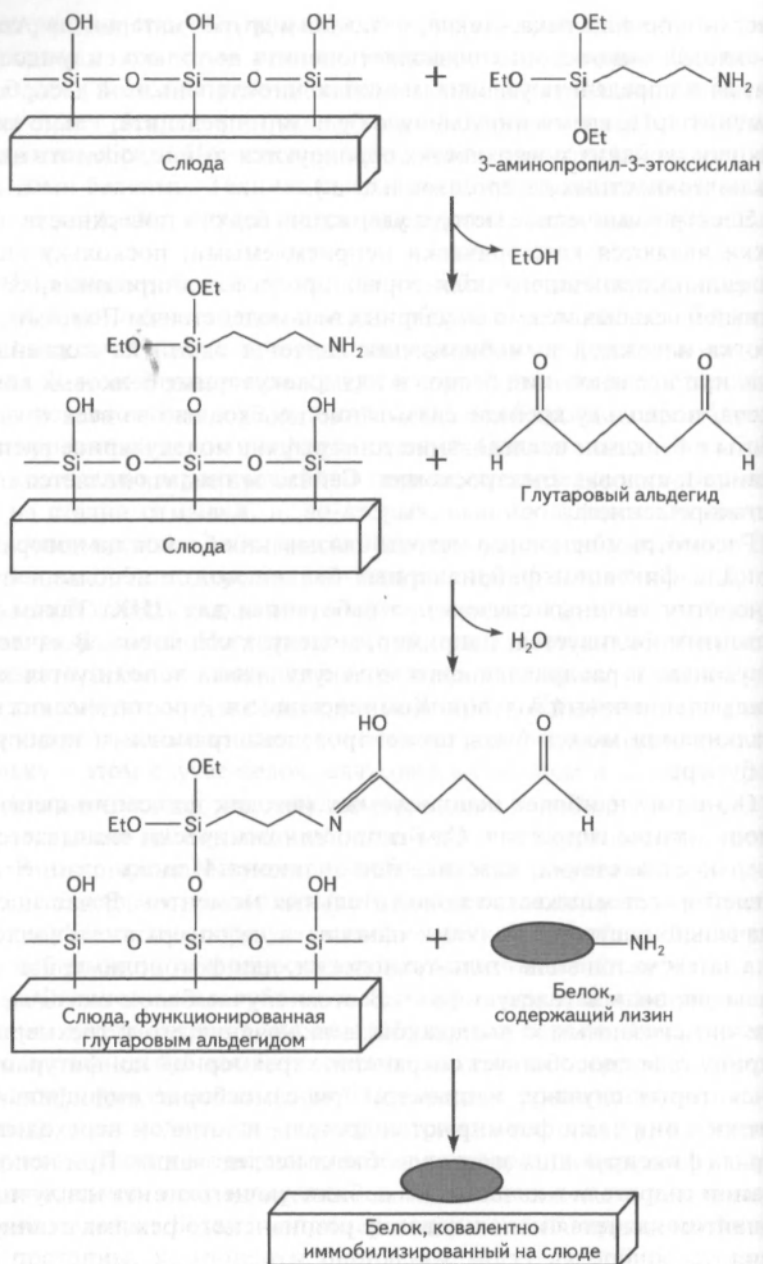


поверхностях пластика, стекла, металлов и других материалов. Атомно-силовая микроскопия позволяет оценить не только силу адсорбции, но и определить условия, изменяющие степень этой адсорбции (изменить pH, время инкубации с белком, определить, какие типы белков и на каких поверхностях сорбируются лучше, оценить влияние поверхностных детергентов и т. д.).

Электрохимические методы удержания белка у поверхности подложки являются категорически неприемлемыми, поскольку наличие сильного внешнего поля сорвет процесс сканирования, основанный на слабых межмолекулярных взаимодействиях. Поэтому разработка надежной иммобилизации является одной из важнейших задач при исследовании белков и надмолекулярных белковых комплексов, поскольку крепкое связывание необходимо во всех случаях работы с белками: исследование топографии, молекулярное распознавание и силовая спектроскопия. Сейчас эта задача является полностью решенной.

Рассмотрим основные методы связывания белков на поверхности. Для фиксации фибриллярных белков может использоваться технология «ионных связей», разработанная для ДНК. Таким образом иммобилизуется, например, молекула коллагена. В качестве связывающего и расправляющего молекулу агента используется краситель альциановый голубой. Компенсация электростатических сил отталкивания может быть также проведена грамотным подбором pH буфера.

Одной из наиболее используемых методик фиксации является использование гидрогеля. Сам гидрогель химически связывается с поверхностью стекла, пластика или силикона. Использование гидрогелей имеет множество положительных моментов. В частности, изначально раствор с белками наносится на поверхность подложки, а затем метод золь—гель-технологии, или фотополимеризации, переводит золь в гелевую фазу. В этом случае белок оказывается надежно связанным с подложкой, а включение его в трехмерную матрицу геля способствует сохранению трехмерной конфигурации. В некоторых случаях, например, при самосборке амфифильных пептидов они сами формируют гидрогель, и тогда он переходит из разряда фиксирующих агентов в объект исследования. При использовании гидрогеля в качестве иммобилизующего агента наилучшим вариантом является использование резонансного режима сканирования.





Еще одним методом иммобилизации белка является первоначальная функционализация подложки, т. е. покрытие ее определенными соединениями, с которыми впоследствии ковалентно связывается белок. Главным преимуществом такого метода фиксации является то, что при сканировании, в том числе в контактном режиме, и при последующих манипуляциях белок не десорбируется с подложки. Этот метод является одним из наиболее используемых. Особенно активно его стали применять после осознания того факта, что функционализировать можно не только подложку, но и поверхность зонда. Соответственно на зонд можно ковалентно привязывать лиганд (или антитело), а на подложку необратимо иммобилизовать рецептор (или антиген) и исследовать аффинность связей в жидкости, не опасаясь десорбции белка. Пример обработки подложки с ковалентной иммобилизацией белка представлен на рис. 2.4.

Достаточно прочные аффинные связи тоже могут быть использованы для фиксации белков на поверхности. Как правило, выбирают стандартную систему авидин/стрептавидин. Аффинная иммобилизация обычно применяется в том случае, если есть опасения, что ковалентное связывание существенно изменит конформацию белка.

Для предотвращения изменения конформации в ковалентном связывании можно использовать линкеры. Дополнительным преимуществом связывания через линкеры, равно как аффинной иммобилизации, является, во-первых, правильное ориентирование белковой молекулы на пространстве подложки или на зонде (что принципиально при изучении белок-белковых взаимодействий) и, во-вторых, отсутствие нежелательного неспецифического связывания.

**Рис. 2.4.** Постадийная обработка свежесколотой слюды с целью необратимой иммобилизации белка: вначале на поверхность наносится 3-аминопропил-3-этоксисилан, образующий силоксановую связь через кислород на поверхности слюды, а этанол удаляется. Затем наносится глутаровый альдегид, фиксирующийся на иминной связи. Связывание глутарового альдегида с аминогруппой может проходить в результате формирования гораздо более стабильной пептидной связи. Далее при добавлении лизинсодержащих белков они ковалентно иммобилизуются на подложке



## 2.4.

**ФИКСАЦИЯ КЛЕТОК ДЛЯ СКАНИРОВАНИЯ  
В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ  
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЖИДКОСТИ**

Наиболее простым решением при исследовании прокариотических и эукариотических клеток является их фиксация, которая убивает клетку и привязывает ее к поверхности подложки. Однако при работе с прокариотами в воздушной среде не требуется применения каких-либо фиксирующих агентов. Основным условием, которое обязательно должно соблюдаться, является тщательная отмывка бактериальной культуры от агара.

Обычно двукратной отмывки оказывается достаточно. После этого бактерии взвешиваются в дистиллированной воде. Использовать разного рода буферы не рекомендуется, поскольку при высыхании мазка происходит кристаллизация солей, и формирующиеся кристаллы могут, во-первых, повредить бактериальную клетку, во-вторых, повредить зонд при работе в контактном режиме сканирования, в-третьих, интерпретировать полученный результат непросто.

Вместе с тем, благодаря наличию прочной клеточной стенки, низкое осмотическое давление дистиллированной воды достаточно легко переносится бактериальной клеткой (хотя время пребывания в дистиллированной воде желательно уменьшать).

Еще одной проблемой пробоподготовки для исследования бактерий является их склонность к агрегации. Как правило, большие разведения не предотвращают этого явления, и для получения изолированных клеток необходимо пропускать бактериальную суспензию через крупнопористые фильтры. После высыхания клеточной культуры на поверхности стекла ее можно сканировать, т. е., процесс подготовки образца занимает очень мало времени. В 1995 г. М. Гад (M. Gad) и А. Икай (A. Ikai) наблюдали за бактериальными клетками прямо на поверхности 3%-го агарового геля. Еще одним способом наблюдать нативные бактериальные клетки является сканирование биопленок. Многие бактериальные культуры (например, *Staphylococcus epidermidis*) способны обрабатывать субстрат. В составе биопленок можно исследовать бактерии, не опасаясь их десорбции. Но недостатком двух последних методов иммобилизации прокариот является то, что в данном случае исследовать можно только группы бактерий или грибов, а не единичные клетки.

Эукариотические клетки нельзя помещать в дистиллированную воду, поскольку их лизис в этом случае неизбежен. Высушивание



клеток на стекле в буферном растворе приводит к значительным деформациям клетки. Поэтому для исследования клеток в воздушной среде их обязательно нужно фиксировать. Для этого подходят хорошо известные методы обездвиживания клеток, такие как обработка спирт-формалиновым раствором, фиксация метиловым и этиловым спиртом.

Рис. 2.5. Благодаря фиксации метанолом (5 мин) зафиксирован процесс формирования псевдоподий нейтрофильным гранулоцитом при фагоцитозе *Staphylococcus aureus*

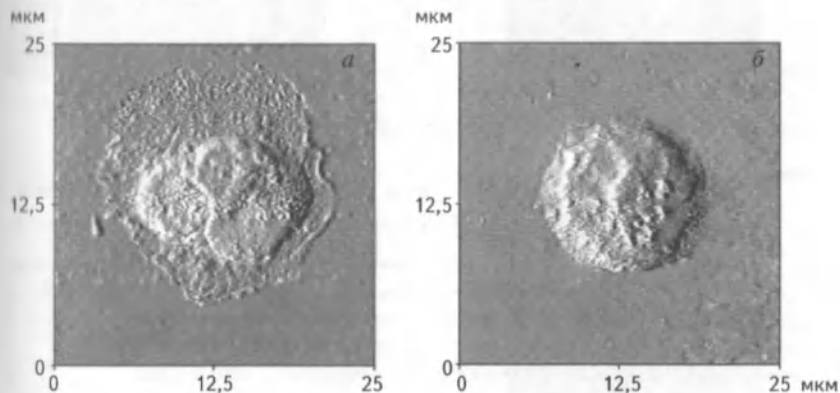


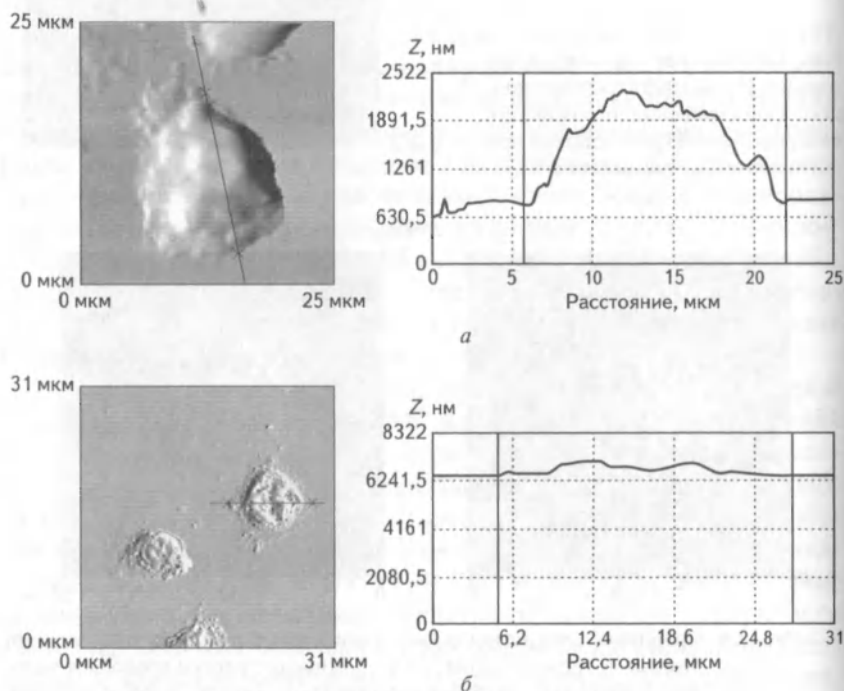
Рис. 2.6. Сравнение двух методов фиксации клеток: при фиксации метанолом (а) подложка чистая, а обездвиживание клетки позволяет четко визуализировать внутреннюю структуру клеток: ядро и гранулы, тогда как использование этанола (б) не позволяет выделять область ядра. Кроме того, отмечается органическое загрязнение подложки

Среди способов фиксации наилучшим является обработка метанолом, поскольку, во-первых, фиксация осуществляется в короткий промежуток времени (5—10 мин), что позволяет захватить интересные моменты физиологических процессов, например фагоцитоза (рис. 2.5).



Во-вторых, отмывка после фиксации может быть сколь угодно жесткой — клетка не удаляется с поверхности подложки. В-третьих, подложка при этом методе фиксации остается очень чистой (рис. 2.6), и, в-четвертых, обезвоживание клетки позволяет рассматривать организацию внутренних структур клетки.

Основной недостаток фиксации метанолом также связан с обезвоживанием. И диаметр клеток и особенно их высота меняются столь существенно, что становится невозможным ориентироваться на данные атомно-силовой микроскопии при определении морфометрических параметров клеток (рис. 2.7).



**Рис. 2.7.** Вверху представлено изображение нативной клетки в жидкости. Клетка исследована методом атомно-силовой микроскопии без использования каких-либо фиксирующих и иммобилизирующих агентов (а). Внизу представлено изображение трех клеток, фиксированных метанолом (б). Боковые профили сечения клеток демонстрируют, насколько сильно фиксация изменяет размеры клеток: диаметр клеток увеличивается, а высота резко снижается





Самое большое распространение в пробоподготовке эукариотических клеток получил способ фиксации с использованием глутарового альдегида (2—4 %, 30—40 мин). Преимущество использования глутарового альдегида заключается в том, что он формирует необратимые сшивки в белковых молекулах мембраны (рис. 2.8), образуя своеобразные «жесткие распорки», и клетка сохраняет форму неизменной (рис. 2.9).

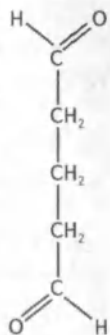


Рис. 2.8. Две реакционно-способные альдегидные группы глутарового альдегида позволяют сшивать различные типы молекул за счет ковалентных связей, вытесняющих атомы водорода

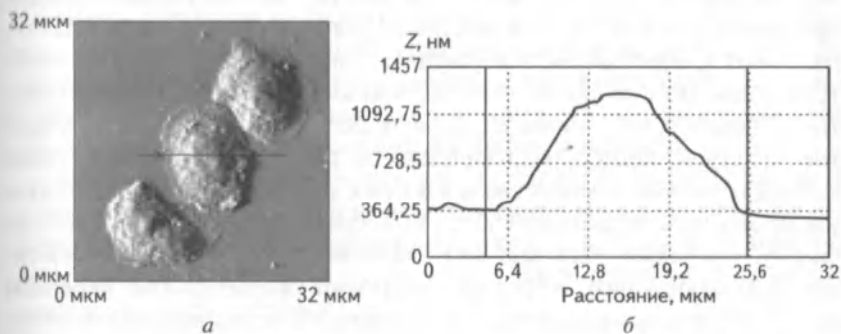


Рис. 2.9. Три клетки фиксированы глутаровым альдегидом. Очевидно, что форма клеток сохраняется близкой к нативной (а), но из анализа бокового профиля клетки (б) следует, что ее размеры все-таки существенно отличаются от размеров нефиксированных клеток

Для того чтобы минимально травмировать клетку, необходимо использовать небольшие концентрации глутарового альдегида, поэтому последующую отмывку образцов необходимо проводить крайне осторожно.

Как бы привлекательным не было долговременное наблюдение за живыми клетками, тем не менее, изучение фиксированных препаратов сыграло чрезвычайно важную роль в биомедицинских исследованиях. Фиксированные препараты эукариотических клеток в настоящее время готовят в следующих случаях:



- необходимость длительного хранения препарата и его повторного использования через определенные промежутки времени;
- необходимость транспортировки препаратов на дальние расстояния;
- необходимость одномоментной фиксации какого-либо важного физиологического процесса;
- необходимость получения изображения с высоким разрешением, поскольку сканирование препаратов клеток на воздухе по-прежнему дает лучшее разрешение, чем исследование в жидкости.

Успешность иммобилизации эукариотических клеток для наблюдений в их естественном нативном состоянии зависит от многих факторов. Для эукариот важными свойствами являются их способность к расплыванию на поверхности подложки, а также увеличение плотности экспрессии адгезивных молекул на мембранах (например, семейства интегринов). Среди клеток, не требующих никакой предварительной обработки подложки для надежной иммобилизации, называют: фибробласты, нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, эндотелиоциты, многие линии злокачественно-трансформированных клеток. Считается, что лучшая адгезивная активность наблюдается у клеток культуры тканей, выращенных на поверхности стекла. Такие клетки не только прочно связываются с подложкой, но и стремятся увеличить поверхность контакта, приобретая относительно плоскую форму, что также облегчает визуализацию при помощи атомно-силовой микроскопии, поскольку исчезают значительные перепады высот. Исследование клеток, прочно иммобилизованных на подложке, выглядит наиболее привлекательным, но в некоторых случаях клетки, не обладающие достаточной адгезивностью, тоже можно исследовать, не прибегая к дополнительной фиксации. Таким образом можно работать, например, с буккальными эпителиоцитами. Это клетки, имеющие плоскую форму и большой диаметр. Для исследования определенного фрагмента мембраны достаточно просто правильно позиционировать зонд и задать область сканирования, не выходя за границы клетки.

Если клетки достаточно высоки, плохо расплываются на поверхности, не выращиваются в монослой и не экспрессируют адгезивных молекул, то требуются методы дополнительной иммобилизации их на подложке. Одним из вариантов может являться обработка поверхности поли-L-лизином, принцип работы которого аналогичен методу «ионных связей». Функционализацию подложки



(слиюды, стекла, полистерола) проводят предварительно: на поверхность наносится капля раствора поли-L-лизина, затем ее подсушивают. После этого поверхность аккуратно отмывают и наносят исследуемый образец. Этот метод успешно использовался для иммобилизации эритроцитов. При иммобилизации с использованием поли-L-лизина следует помнить, что возможна его ограниченная диффузия в приповерхностном слое, поэтому нужно избегать использования контактного режима сканирования. В целом, нужно отметить, что использование химической предобработки подложки для фиксации клеток не является наилучшим вариантом в отличие от аналогичного способа иммобилизации белка, поскольку поверхностное натяжение мембраны нативной клетки может существенно изменяться вследствие появления заряда на поверхности, выводя ситуацию за рамки физиологических исследований. Гораздо лучшим выходом является иммобилизация клеток на компонентах внеклеточного матрикса, например на белках коллагена. В данном случае, во-первых, исключаются негативные моменты, связанные с диффузией химических компонентов и поверхностным натяжением мембран, а во-вторых, формируется абсолютно физиологичная ситуация взаимодействия между клеткой и экстрацеллюлярным матриксом.

Вариантом обездвиживания клеток является их помещение на трековые мембраны. Именно использование трековых мембран для фиксации дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* позволило добиться латерального разрешения в 2 нм — это самое высокое разрешение, которого удалось достичь к настоящему времени для живых микробных клеток. Такой способ позволяет разрешить трудность, возникающую при визуализации больших клеток округлой формы, — появление артефактов при сканировании резких перепадов высоты клетки на ее границе (рис. 2.10).

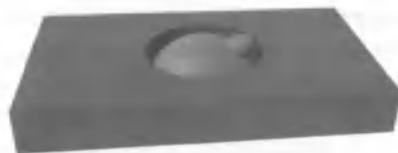


Рис. 2.10. Схема иммобилизации дрожжевых клеток на трековых мембранах

В независимости от того, применяются или нет фиксирующие и иммобилизующие агенты, всегда следует помнить о том, что в биологических исследованиях достоверность полученных результатов напрямую зависит от числа проведенных экспериментов. Необходимо набирать статистически значимый набор сканов. Это позволит избежать влияния артефактов и сделать выводы надежными.



## 2.5. ВЫБОР ЗОНДОВ ДЛЯ СКАНИРОВАНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

При выборе зондов и режимов сканирования существуют общие проблемы атомно-силовой микроскопии, не зависящие от специфики исследуемого объекта. Они определяются конструктивными свойствами прибора и могут быть преодолены. Но некоторые моменты подбора оптимальных зондов и режимов сканирования необходимо учитывать, исходя из особенностей медицинских и биологических объектов. В частности, биологические и медицинские объекты имеют такие нежелательные для сканирования (т. е. контакта с механически прочным зондом) свойства, как высокая мягкость и липкость.

Зонд представляет собой острую иглу, закрепленную на конце кантилевера. Геометрические характеристики этой иглы могут стать критичными для проведения сканирования и обработки результатов. Например, благодаря АСМ-сканированию можно определить размеры биологического образца по трем координатам ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) с высокой точностью. Однако истинности оценки линейных размеров по трем координатам мешают такие явления, как контактная деформация и конволюция. При взаимодействии зонда и образца (особенно такого мягкого, как биологический образец) с достаточно большой прижимающей силой происходит локальное «продавливание» поверхности, поскольку контактная площадка очень мала. В результате высота снимаемого профиля отличается от реального недеформированного рельефа. Это явление носит название контактной деформации. Как правило, время релаксации для биологических объектов очень мало и они способны быстро восстановить первоначальную форму. Но ряд негативных моментов остается:

- происходит запись и обработка информации из  $z$ -канала о высоте объекта именно в момент деформации, т. е. последующая оценка размеров образца по оси  $z$  будет заведомо неверной;
- воздействие зонда на механорецепторы живых клеток вызывает их активацию, открывание механозависимых ионных каналов и, как следствие, возникновение ионного дисбаланса, который выводит клетку из гомеостатического состояния;
- воздействие силы, превышающей некоторый пороговый уровень прочности, может вызвать не только контактную деформацию, но и разрушение биологического образца;



- плотное прижатие зонда к образцу вызывает «залипание» органических молекул на поверхности зонда и может сломать его.

В режиме прерывистого контакта (резонансный режим сканирования) наблюдается обратное явление — завышение вертикального размера образца. О.И. Киселева и И.В. Яминский в книге «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров» приводят несколько обоснованных объяснений этому явлению:

- завышение связано с упругими свойствами крупных органических молекул;
- ошибки отображения обусловлены распределением заряда на поверхности биологических объектов и возникающей вследствие этого неравномерности изменения амплитуды колебания кантилевера в *tapping-mode* режиме;
- наличие флуктуаций белковых молекул при сканировании нативных препаратов в жидкости;
- наличие слабо адсорбированных ионов и молекул, искажающих истинные размеры биологических объектов при сканировании в воздушной среде.

К этим причинам можно добавить также наличие сил вязкого отталкивания при приближении зонда к образцу и возникновении локальной компрессии при сканировании в жидкости, которые обсуждались в гл. 1.

Еще одной проблемой, проистекающей из геометрии зонда, является эффект конволюции — уширение горизонтальных размеров образца, связанное с тем, что радиус закругления кончика зонда превышает радиус исследуемого объекта (рис. 2.11). Еще одним вариантом конволюции является сглаживание ступенек, образующих угол  $90^\circ$ . Но исследования таких объектов, представляющих большой интерес для материаловедения и физики поверхностных структур, для биологии большого значения не имеют.

Есть несколько способов преодоления проблем, связанных с появлением контактной деформации и конволюции. Условно их можно разделить на методы компьютерной обработки и конструктивные решения. Компьютерная обработка АСМ-данных проводится с учетом конкретной формы зонда. В методе численной деконволюции вначале экспериментально определяется истинная форма зонда по тестированию на калибровочных решетках, а затем после проведения процедуры обратной свертки вносимые ей погрешности математически вычитаются из получаемого при сканировании изобра-



жения, благодаря чему получают восстановленный истинный рельеф поверхности. Однако метод математического восстановления имеет некоторые ограничения, так как требует дополнительного исследования геометрии зонда и не всегда точно восстанавливает исследуемую поверхность.



Рис. 2.11. Конволюция на примере получения изображения молекулы ДНК

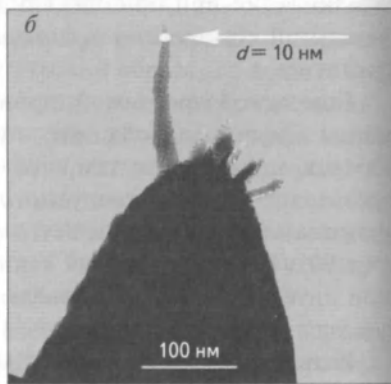
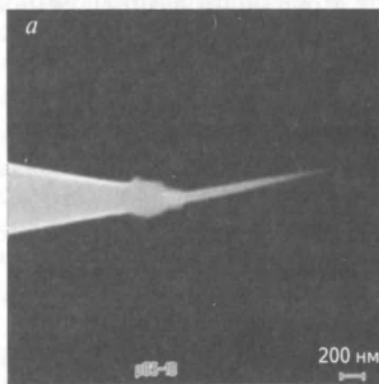


Рис. 2.12. Примеры тонких и сверхтонких зондов:

*a* — зонд типа «whisker» с длиной 1 мкм и радиусом закругления кончика 10 нм; *б* — сверхострый зонд из искусственного алмаза (рисунки взяты с сайта компании NT-MDT, Россия: [www.ntmdt.ru](http://www.ntmdt.ru))

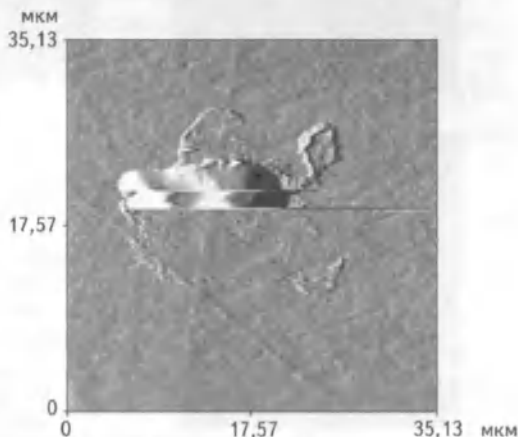
Поэтому предпочтение отдается конструктивным решениям. В частности, минимизировать эффект конволюции позволяет использование сверхтонких зондов (рис. 2.12). Изначально для этой



цели применяли зонды типа «whisker» (англ. — кошачий ус). Радиус закругления кончика таких зондов составлял порядка 10 нм. Но сейчас созданы и очень успешно работают сверхтонкие зонды, полученные в нашей стране благодаря разработкам группы проф. Д.В. Клинова (Москва). Острие искусственного алмаза, выращенного на кончике зонда, имеет радиус закругления — 1 нм, к тому же он достаточно короткий для того, чтобы обеспечить необходимую прочность. Группа профессора Н. Вана (N. Wang, США) пошла по другому пути и вырастила на кончике зонда нанотрубку диаметром 2 нм.

Такие зонды идеально подходят для исследования линейных биологических молекул, где эффект конволюции может внести существенные коррективы не только в определении высоты, но и в оценке степени периодичности (ДНК, коллаген).

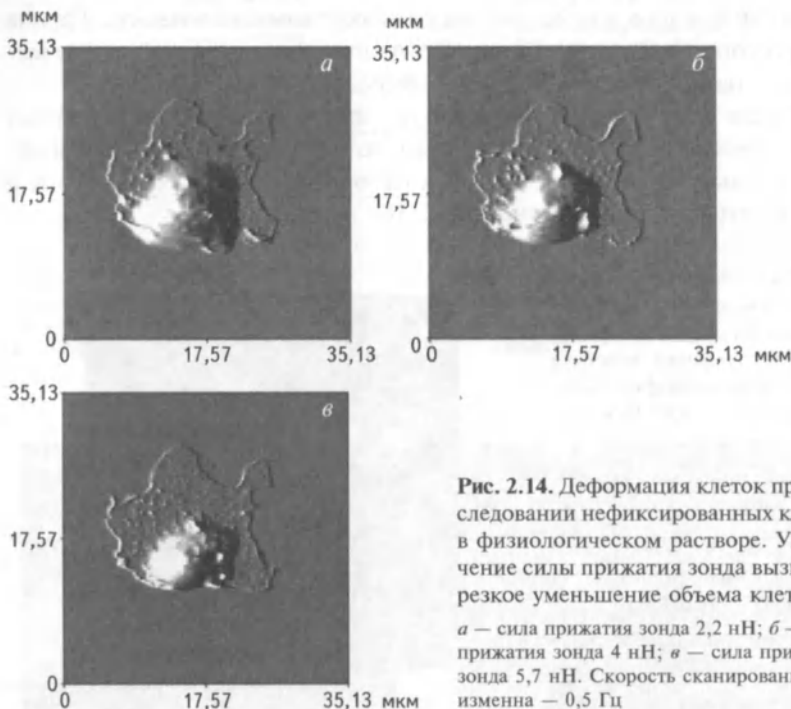
**Рис. 2.13.** «Разрезание» клетки зондом с углом схождения конуса острия  $22^\circ$ , радиусом закругления кончика зонда 10 нм и коэффициентом упругости 0,03 Н/м



Требования к зондам, используемым для сканирования клеток, являются прямо противоположными. Во-первых, это обусловлено необходимостью реализации неразрушающих методик (а острые зонды травматичны для клеток), во-вторых, эффект конволюции принципиальный в исследовании биомолекул теряет значимость при визуализации клеток. Длина и ширина зонда в этом случае не являются критическими факторами, а определяющей является геометрия зонда. В частности, угол схождения конуса острия должен быть как можно большим (порядка  $70^\circ$ ), поскольку слишком острые углы схождения (около  $20^\circ$ ) вызывают разрушение клеток (рис. 2.13). Не менее важен и радиус закругления кончика зонда, здесь в противоположность методам исследования биологических молекул наблюдается обратная зависимость: чем больше радиус, тем лучше качество изображения.



В клеточной биологии используются радиусы закругления порядка 50 нм. Многие исследователи, работающие с нативными клетками, а особенно исследующие их упругость в режиме FS-спектроскопии, настаивают на том, что лучше всего использовать не традиционные пирамидальные, а шаровидные зонды.



**Рис. 2.14.** Деформация клеток при исследовании нефиксированных клеток в физиологическом растворе. Увеличение силы прижатия зонда вызывает резкое уменьшение объема клеток:

*a* — сила прижатия зонда 2,2 нН; *б* — сила прижатия зонда 4 нН; *в* — сила прижатия зонда 5,7 нН. Скорость сканирования неизменна — 0,5 Гц

В контактном режиме сканирования определяющими являются такие факторы, как жесткость кантилевера и сила прижатия зонда к образцу. Нитрид-кремниевые кантилеверы, применяемые для биологических исследований, должны иметь коэффициент жесткости порядка 0,01 Н/м. Обычно после установления обратной связи сканирование объекта должно производиться при силе прижатия порядка 1—1,5 нН. Она обеспечивает тщательную проработку деталей биологического объекта и практически не вызывает контактной деформации образца. Увеличение силы прижатия зонда вызывает значительную деформацию клеток, что наглядно демонстрируется на рис. 2.14.





Прижатие зонда с силой 5,7—6 нН вызывает гибель клеток. Принципиальной для контактного режима является и скорость сканирования. Биологические процессы протекают с разной скоростью, среди них отмечаются как очень быстрые (ферментативный катализ, формирование поросом, открытие ионных каналов и т. д.), так и достаточно медленные (апоптотическая гибель клеток, митотическое деление и т. д.). Для наблюдения за динамикой медленных процессов оптимальной является установление скорости сканирования порядка 0,5 Гц. Увеличение скорости более 1 Гц нецелесообразно, поскольку обратная связь не успевает обрабатывать мелкие детали клеток из-за быстрого перепада высот, что приводит к значительному падению разрешения. В настоящее время для снятия динамики быстрых биологических процессов предложен метод высокоскоростной атомно-силовой микроскопии, который будет обсуждаться в гл. 6. Чрезмерное уменьшение скорости сканирования также может иметь негативные последствия. Снижение скорости прохождения зонда при прежней силе воздействия зонда на образец может вызвать разрушение биологического объекта.

Увеличить скорость сканирования позволяют и резонансные режимы сканирования. Для tapping-mode оптимальна скорость 2 Гц. Как уже отмечалось, для колебательных режимов подбираются зонды с большим коэффициентом упругости, чем для контактного сканирования с целью получения большего разрешения. Однако в биологических исследованиях слишком большая жесткость не допустима —  $k$  должен находиться в пределах 0,05—0,5 Н/м. Все рассуждения относительно геометрии зонда верны и для резонансного режима сканирования. Но появляется еще одна составляющая, принципиальная для получения качественного изображения — резонансная частота колебаний кантилевера. Резонансные частоты колебаний кантилевера в жидкости уменьшаются из-за увеличения эффективной массы зонда. Кроме того, анализ в жидкости амплитудно-частотной характеристики показывает наличие множества пиков, возникающих в результате температурных и акустических флуктуаций. Наилучшие результаты показывают зонды с резонансной частотой в области 10—30 кГц. Немаловажным фактором является и корректно выставленный отклик обратной связи. В зависимости от выбранного зонда коэффициент отклика обратной связи составляет от 0,2 до 0,5.

Еще одной проблемой атомно-силовой микроскопии при исследовании биологических объектов является «липкость» биомолекул.



Важным аспектом является тот факт, что зонд может необратимо фиксировать некоторые биологические молекулы на своей поверхности, что приводит, с одной стороны, к снижению качества получаемого изображения и артефактам, а с другой стороны, невозможно использовать такой зонд повторно, что снижает экономическую выгоду метода АСМ. Возникает необходимость обрабатывать зонд специальными веществами, снижающими адсорбцию органических молекул. Хотя в последнее время набирает обороты прямо противоположная тенденция: функционализация зондов с тем, чтобы к ним можно было прочно привязать не только отдельные органические молекулы (ДНК, белок), но и целые клетки.

Таким образом, все преодолимые ограничения метода атомно-силовой микроскопии в настоящее время полностью сняты. Он является перспективным и уникальным в решении многих биологических и медицинских задач. Действительно, на модельных системах *in vitro* можно отслеживать морфофункциональные изменения живых клеток в ответ на различные воздействия, т. е. качественно тестировать влияние физических (электромагнитное излучение, радиационное воздействие), химических (фармацевтические и/или токсические препараты), биологических (микроорганизмы) факторов в режиме реального времени. АСМ позволяет получить качественные изменения на уровне одной клетки и рассматривать несколько клеток, получая усредненные результаты. Подробнее варианты применения атомно-силовой микроскопии в биологических исследованиях рассмотрим в гл. 3—5.

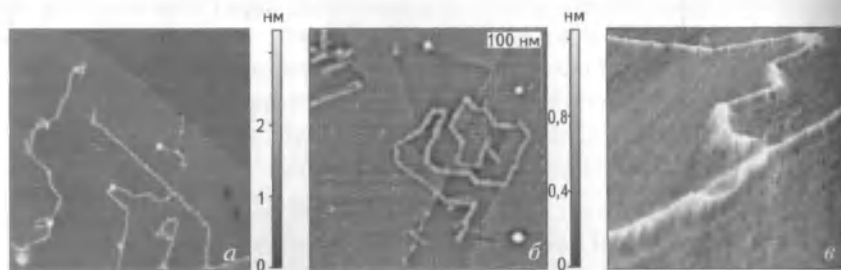
Биологические исследования с использованием атомно-силовой микроскопии можно проводить на нескольких уровнях: субмолекулярном, молекулярном, надмолекулярном, клеточном. На каждом из них рассматривают структурные, функциональные особенности, а также вносят определенную коррекцию, моделируя заданные ситуации с помощью механического зонда или химических компонентов. Особенностью атомно-силовой микроскопии является возможность работы только с единичным биологическим объектом (одной молекулой, одной клеткой), в то время как традиционные физиологические и биохимические тесты дают усредненные показатели для популяции в целом. Изучение единичных объектов предоставляет уникальную возможность выделять субпопуляции, которые обычно нивелируются в процессе получения множественных усредненных данных.

### 3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК

ДНК была первым биологическим объектом, рассмотренным с помощью сканирующей зондовой микроскопии (с использованием сканирующей туннельной микроскопии, которая появилась раньше АСМ). Изучение ДНК методом АСМ касаются в основном структурной организации, упаковки ДНК, формирования нуклеосом и реализации функциональной активности молекулы. Использование сверхострых зондов (диаметром 1–2 нм) позволяет делать точные оценки размеров молекулы, избегая эффекта конволюции (рис. 3.1). Кроме того, используя атомно-силовую микроскопию, можно производить картирование ДНК и создавать биосенсоры, в основу которых положен принцип комплементарного распознавания.



Методом АСМ рассматривается ДНК разных живых организмов: ДНК-содержащих вирусов, прокариотических, эукариотических клеток. Естественно, что и укладка, и молекулярная масса, и емкость генетической информации у них существенно различается.

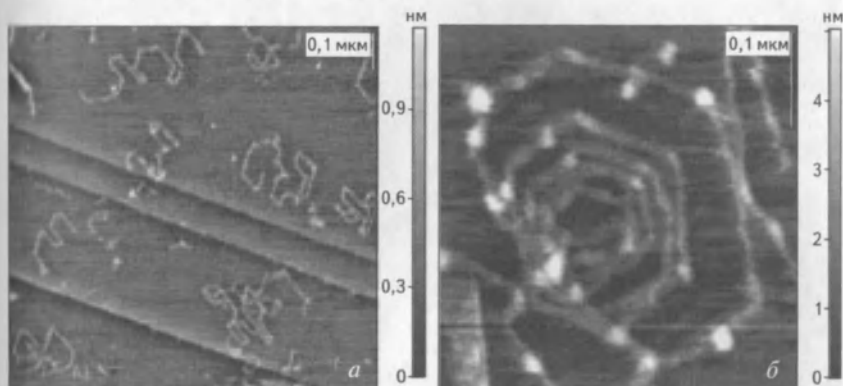


**Рис. 3.1.** Высokоразрешающая АСМ-микроскопия ДНК молекул, иммобилизованных на высокоориентированном пиролитическом графите, модифицированном октадециламином. Размеры сканов 520 × 520 нм (а); 340 × 340 нм (б); 200 × 200 нм (в). Изображение перепечатано с «Colloids and Surfaces B: Biointerfaces» (2010) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

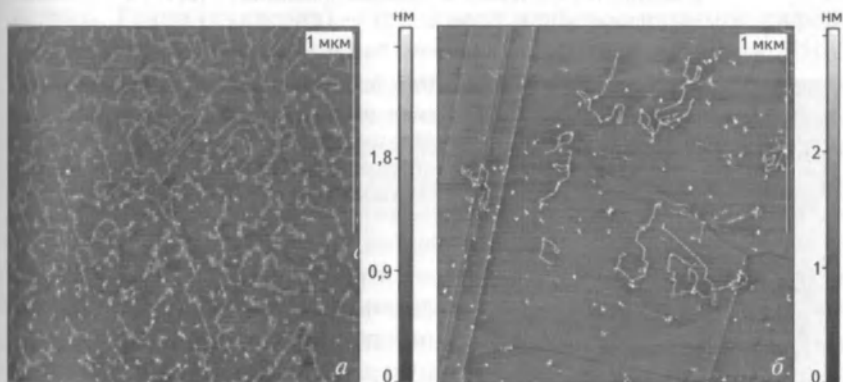
Вирусы интересны тем, что в них обнаруживается всегда только один тип нуклеиновой кислоты: либо ДНК, либо РНК. Все другие живые системы обязательно содержат оба типа нуклеиновых кислот. Структура нуклеиновой кислоты также может существенно варьировать. Вирусный геном представлен как однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами ДНК и РНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой, РНК — непрерывной или фрагментированной, линейной или кольцевой молекулой. Отличается также укладка молекул ДНК или РНК в вирионе. Некоторые молекулы суперспирализованы и не связаны со структурными белками вириона. Но есть и вирусы с терминальными белками, которые соединены с концом вирусной нуклеиновой кислоты ковалентно. Структурная организация вирусной нуклеиновой кислоты оказывает влияние на процесс пробоподготовки и сканирования. Особенно активно методом АСМ исследуется ДНК бактериофагов (Т4, фаг λ и т. д.). В настоящее время отработаны методики их исследования как в воздушной среде, так и в растворах. Для получения отдельных, невзаимодействующих молекул концентрацию ДНК в буфере значительно снижают, но степень «расправленности» ДНК на подложке зависит не от концентрации молекул, а от типа подложки, нали-



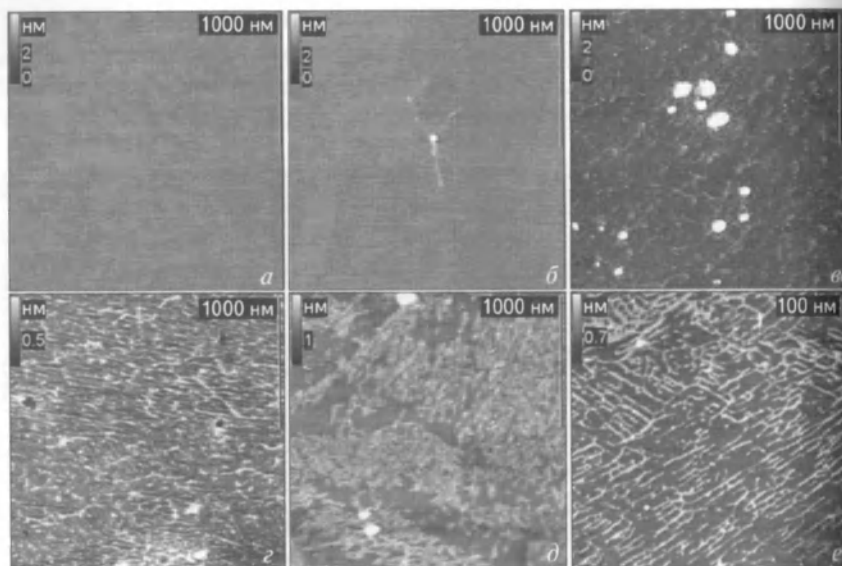
чия или отсутствия на ней функционального покрытия, состава и pH буфера (рис. 3.2, 3.3). На рис. 3.4 показано, как концентрация раствора NaCl в буфере, содержащем ДНК, влияет на плотность высаживания молекул на подложку.



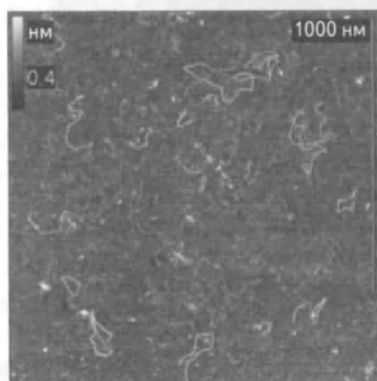
**Рис. 3.2.** ДНК иммобилизована на высокоориентированном пиролитическом графите, модифицированном октадециламином. Молекула высажена из раствора. Отмечаются разные углы изгиба ДНК (*а*, *б*). Изображение перепечатано с «Colloids and Surfaces B: Biointerfaces» (2010) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина



**Рис. 3.3.** ДНК иммобилизована на высокоориентированном пиролитическом графите, модифицированном октадециламином. Равновесная (*а*) и неравновесная (*б*) конформации молекулы. Изображение перепечатано с «Colloids and Surfaces B: Biointerfaces» (2010) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина



**Рис. 3.4.** Последовательности поли-А, содержащиеся в растворе в концентрации  $10^{-3}$ , перенесены на подложку, модифицированную стеариновой кислотой. Концентрация NaCl в буфере была соответственно 0 мМ (а), 10 мМ (б), 100 мМ (в), 500 мМ (г) и 1 М (д, е). Изображение перепечатано с «Biomacromolecules» (2007) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина



**Рис. 3.5.** Молекула ДНК иммобилизована на поверхности силанизированной слюды. Изображение перепечатано с «Biomacromolecules» (2007) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

Например, в протоколе исследования ДНК (<http://www.ntmdt.ru>) говорится о том, что релаксированную молекулу ДНК можно получить на поверхности свежеотколотой слюды или при исследовании в буфере, содержащем двухвалентные катионы, тогда как нанесение молекулы на функционализированную подложку (слюда обработана поли-L-лизином или сила-



низирована) вызывает сильнейшую конденсацию ДНК (рис. 3.5). Соответственно и использование этих методик будет разным: при необходимости картирования или изучения белок-нуклеиновых взаимодействий лучше всего использовать релаксированную ДНК, а для изучения конденсации, суперспирализации и укладки подходит функционализированная поверхность.

На нуклеиновых кислотах вирусов отработаны многие методики исследования. В частности, в книге под редакцией профессора И.В. Яминского «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров» описаны следующие варианты применения АСМ в изучении нуклеиновых кислот вирусов:

- картирование областей РНК ретровируса HERV-K10: фрагменты РНК, содержащие определенное количество пар оснований, формировали специфические *R*-кольцевые структуры, которые легко могли визуализироваться методом АСМ (Клинов Д.В., 1997);

- исследование процесса «раздевания» вируса табачной мозаики, т. е. моделирование процесса высвобождения РНК под влиянием поверхностно-активного вещества — диметилсульфоксида, мочевины, щелочных буферов (Другин Ю.Ф. и др., 1997).

ДНК внутри клеток имеет иное расположение, чем в вирусных частицах, где она защищена только белковым капсидом. В прокариотических клетках (бактериях) ДНК может быть представлена в двух формах. Геном (нуклеоид) — хранилище наиболее значимой информации, представляет собой кольцевую суперспирализованную ДНК. Но помимо большой стационарной ДНК бактерии имеют уникальные мобильные фрагменты генома — кольцевые плазмиды — ДНК, которая при определенных условиях может передаваться от одной клетки к другой. Плазмиды играют важнейшую роль. Именно они обеспечивают феномен «вертикальной эволюции» бактерий, именно они ответственны за возникновение феномена множественной резистентности (устойчивости) бактерий к действию антибиотиков и именно наличие у бактерий плазмид сыграло большую роль в возникновении генетической инженерии. Поскольку плазида имеет небольшие размеры и легко выделяется из клеток, она очень удобна для исследования методом атомно-силовой микроскопии. Например, с использованием плазмид можно изучать организацию палиндромов — инвертированных повторов ДНК (перевертышей, которые читаются одинаково и от 3'-к 5'-концу и наоборот). В частности, было показано, что палиндромы в ДНК могут присутствовать в



двух конформационных состояниях: в линейной двунитевой форме или в виде крестообразной структуры, состоящей из двух симметричных шпилек. Метод АСМ позволяет не только рассмотреть эти структуры, но и определить условия их образования. Например, установлено, что линейные формы образуются в основном в релаксированных ДНК, тогда как отрицательно суперспирализованная ДНК формирует крестообразную структуру. Модифицируя условия сканирования (температуру, подложку), можно получить стабильно воспроизводимую крестообразную структуру. А поскольку атомно-силовая микроскопия позволяет проводить точные измерения, то достаточно легко оценивается длина шпилек, формирующих крестообразную структуру. Для плазмиды рUC8 длина одной шпильки составила 9 нм. Далее используя компьютерное моделирование и зная, что на шаг двойной спирали В-формы ДНК (3,6 нм) приходится 10—10,5 пар нуклеотидов, можно рассчитать количество пар нуклеотидов, образующих шпильку креста. А поскольку палиндромные последовательности легко атакуются рестриктирующими эндонуклеазами, то крестообразную структуру можно выделять рестриктазами. Затем полученные фрагменты разгоняются в двумерном электрофорезе, и полученные данные сопоставляются с результатом исследования методом АСМ. В случае с плазмидой рUC8 АСМ позволила определить точный размер крестовидной структуры (18 нм, так как состоит из двух шпилек), а моделирование и термодинамический анализ подтвердили, что в образовании креста принимают участие 52 нуклеотида. АСМ помогает и в детальных структурных исследованиях крестов, так как шпильки могут быть образованы и комплементарными инвертированными повторами одной цепи и повторами, принадлежащими разным цепям ДНК.

Наиболее сложно уложена ДНК эукариотических организмов. Существование ДНК в виде хроматина предполагает сложную упаковку с участием гистонов и негистоновых белков. Поэтому на первый план в АСМ-исследованиях ДНК эукариот выходят белок-нуклеиновые взаимодействия. Хроматин состоит из повторяющихся фрагментов — нуклеосом. Каждая нуклеосома представлена гистоновым октамером, на котором в левоспиральные супервитки накручена ДНК длиной 146 пар нуклеотидов (ДНК делает 1,7 оборота на гистоновом остове). А вот длина ДНК между двумя рядом расположенными нуклеосомами может быть разной и зависит от типа клеток. Поскольку 75 % всей ДНК эукариот уложена в нуклеосомы, их





структурная организация оказывает огромное влияние на реализацию всех функций «самой главной молекулы»: транскрипцию, репликацию, рекомбинацию, репарацию. Для того чтобы понять структуру и организацию сложных систем, лучше всего подходят упрощенные модели. Например, искусственно конструируют или выделяют олигонуклеосомы последовательности (содержащие всего 2—3 нуклеосомы). Олигонуклеосомы достаточно просто иммобилизовать на подложке, используя аффинное связывание. Для этого подложку функционализируют стрептавидином, а на 5'-конец ДНК сажают биотин. Между биотином и стрептавидином происходит прочное аффинное связывание (по механизму конформационного совпадения — «ключ к замку»). Таким образом, достаточно крупная молекула биотина выполняет сразу две функции: иммобилизация и разметка. АСМ-анализ показывает, что олигонуклеосомы, образованные очищенным гистоновым ядром и ДНК, представляют собой структуру в виде «шариков на нити». Поскольку атомно-силовая микроскопия позволяет с высокой точностью определять линейные размеры, то в каждой создаваемой модельной системе можно определить межнуклеосомное расстояние, рассчитать сколько пар оснований ДНК образуют один виток на гистоновом остове и как далеко расположены нуклеосомы от меченного биотином 5'-конца ДНК.

Эта модель позволяет манипулировать с разными составляющими олигонуклеосомного комплекса. Например, можно менять состав гистоновых белков в остове (исключать, перемещать или включать другие белки в его состав), заставлять флуктуировать нуклеосому (при изменении pH, молярности и состава раствора она становится более или менее компактной). Измеряя при этом межнуклеосомное расстояние или количество пар оснований в одном витке ДНК на нуклеосоме, определяют, каким образом хроматин функционирует *in vivo*. Кроме того, подбираются искусственные лиганды, которые помогают понять, каким образом изгибается молекула ДНК перед наматыванием на остов, какие белки вместо гистоновых могут быть использованы для укладки ДНК, а какие категорически не подходят для формирования сколько-нибудь стабильной структуры. Например, в составе тривалин-ДНК-комплекса макромолекула формирует большое разнообразие структур: изгибается в форме ракетки, в виде очков, приобретает форму кренделя. Как ни один другой метод атомно-силовая микроскопия предоставляет информацию о чрезвычайной гетерогенности любого природного образования, в том



числе и о структурах, формируемых ДНК. Поэтому, проводя исследования с нуклеиновыми кислотами, необходимо помнить о двух вещах:

- 1) точно воспроизводить все условия проведения эксперимента;
- 2) набирать большой статистический материал, чтобы выводы по математическому определению линейных размеров ДНК были корректными.

Сейчас отмечается тенденция к переходу от простых модельных систем к исследованию структуры и динамики работы нативного хроматина в режиме реального времени. Это направление закрепились и в связи с тем, что метод АСМ позволяет манипулировать с отдельными волокнами хроматина и проводить силовые измерения. Оказалось, что силовые воздействия оказывают огромное влияние на сборку и разборку нуклеосом. При реализации функций ДНК (репликация, транскрипция) эти процессы чередуются постоянно. И ДНК- и РНК-полимеразы относятся к сильнейшим молекулярным моторам, которые развивают силу до 30–40 пН, удаляя гистоновые октамеры на своем пути. Вытянутый под действием полимераз фрагмент молекулы ДНК должен достаточно быстро преобразовать хроматин таким образом, чтобы и укладка, и регуляторные функции восстановились, т. е. нужно установить, может ли ДНК в состоянии натяжения формировать витки вокруг гистоновых октамеров и какая сила натяжения должна воздействовать на ДНК, чтобы происходил процесс самосборки нуклеосом. Режим силовых измерений АСМ показал, что скорость упаковки ДНК в нуклеосомы напрямую зависит от силы натяжения молекулы, а при увеличении силы воздействия до 10 пН процесс сборки нуклеосомных структур ингибируется. Варьируя силу воздействия, можно демонстрировать динамическое равновесие между процессами сборки-разборки на уровне единичного волокна.

Взаимодействие ДНК с полимеразми вообще является одним из самых интригующих вопросов молекулярной биологии. В АСМ-исследованиях на плоскости показано, что в области прикрепления к ДНК фермента (РНК-полимеразы) происходит изгиб макромолекулы, а угол этого изгиба зависит от сайта связывания, т. е. при продвижении РНК-полимеразы по ДНК меняется не только натяжение ДНК, но и происходят конформационные изменения самого фермента. В случае последовательного проведения эксперимента, когда на подложку первоначально иммобилизуется ДНК, а затем,



после старта сканирования, вносится РНК-полимераза, связывание фермента с нуклеиновой кислотой и формирование макромолекулярного комплекса происходит через несколько секунд. Это предоставляет возможность детально исследовать архитектуру образующегося комплекса (закрытый или открытый, определить угол изгиба молекулы ДНК) и оценивать активность регуляторных факторов. Однако динамику процесса, равно как и исследование действия активаторов и супрессоров транскрипции, в таком случае рассматривать нельзя. Дело в том, что иммобилизация ДНК на заряженной подложке так меняет конформацию молекулы, что движение полимеразы затрудняется. Есть два выхода из создавшегося положения:

1) в буфере смешать ДНК и РНК-полимеразу, затем высадить образовавшийся комплекс на подложку и сканировать его;

2) к подложке на специальных линкерах пришить белок (например, ту же РНК-полимеразу), а затем добавить молекулу ДНК (рис. 3.6).

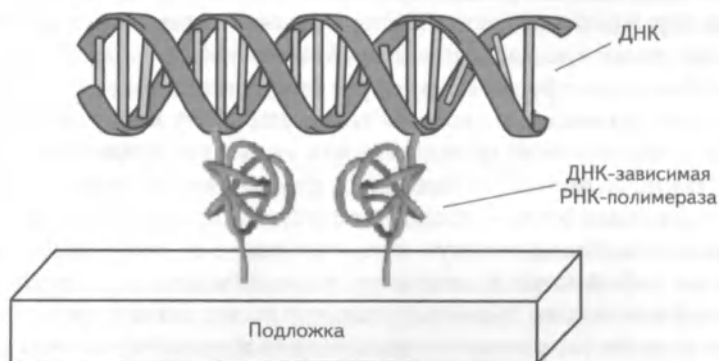


Рис. 3.6. Схема динамического исследования взаимодействия между РНК-полимеразой и ДНК

Второй подход является гораздо более предпочтительным, поскольку конформационных изменений, запрещающих движение, в этом случае не происходит: белок не видоизменяется, поскольку он связан с подложкой через линкеры (он в этой системе стабилен), а ДНК не видоизменяется, поскольку взаимодействует с белком (она мобильна). Заряженная подложка, которая могла бы вызвать конформационные изменения ДНК, находится слишком далеко от молекулы. Плюсом такого исследования является и то, что, подключая



высокоскоростную микроскопию, можно наблюдать динамику и регуляцию образования комплекса ДНК—РНК-полимераза. Представленная модель дает возможность менять кинетику процесса, варьируя разные параметры: ферменты, фиксированные на подложке, рН среды, температуру, концентрацию молекул ДНК, применять одно- и двунитевые ДНК и т. д. Поскольку в регуляции транскрипции участвует достаточно большое число молекул, в настоящее время акцент смещается на исследования ДНК-мультибелковых комплексов.

Методом АСМ можно исследовать и структурную организацию метафазных хромосом. Например, если хромосому обработать трипсином, окрасить красителем Гимза и высушить, то в оптической микроскопии можно выявить G-полосы, которые являются хорошо воспроизводимыми и поэтому широко используемыми для карiotипирования. При сканировании было выявлено, что G-позитивные полосы образованы агрегацией волокнистых структур диаметром 50—100 нм, которые отсутствовали в G-негативных полосах. Таким образом было доказано, что обработка трипсином экстрагирует протеины преимущественно в G-негативных полосах, формируя свободные и хрупкие структуры хроматиновых волокон.

Конформационные свойства молекулы ДНК представляют немалый интерес, поскольку изменение укладки и формы молекулы ДНК важно в процессах проникновения нуклеиновой кислоты в бактериальную клетку — трансформация, трансдукция, конъюгация и в эукариотическую клетку — трансфекция. Все эти процессы имеют четко выраженную практическую направленность: применяются в геной инженерии, используются для исследования умеренных и литических фагов, рассматриваются с точки зрения феномена резистентности к антибиотикам. Метод АСМ достаточно быстро и наглядно демонстрирует, каким образом изменяется конформация ДНК после взаимодействия с разного рода веществами. Например, в результате взаимодействия с поверхностно-активными веществами (или в 50%-м водном растворе изопропанола) макромолекула сворачивается в компактный тороидальный комплекс, который хорошо растворяется в хлороформе. В двухфазной системе вода/хлороформ гидрофобные тороподобные комплексы ДНК—ПАВ переходят из водной среды в хлороформ, пересекая границу раздела фаз. Таким образом, создавая многофазные системы, можно моделировать ситуацию *in vivo*, а именно находить оптимальную форму молекулы ДНК, в которой время проникновения через липидный бислой окажется



минимальным. Однако в такого рода исследованиях не нужно забывать и об условиях возвращения ДНК в нативную, функционально активную конформацию. Не менее перспективным оказывается изучение процессов взаимодействия ДНК с поверхностными белковыми, липидными и белок-липидными субстратами, позволяющее моделировать процессы самосборки. Определение механизмов взаимодействия ДНК с белок-липидными комплексами помогает моделировать самоорганизацию вирусных частиц. Практический выход исследований также очевиден — формирование самоассоциирующихся монослоев на поверхности используется в создании ДНК-сенсоров.

АСМ позволяет также решать задачу картирования ДНК, так как молекулу можно размечать маркерами, имеющими сродство к определенным последовательностям нуклеотидов, а далее, учитывая длину молекулы, определять, как далеко от конца молекулы (через какое количество пар оснований) находится интересующий фрагмент. Для того чтобы сделать маркер заметным для атомно-силовой микроскопии, его укрупняют достаточно большим, но индифферентным к молекуле ДНК белком (бычий сывороточный альбумин, белок *A Staphylococcus aureus* и т. д.). Можно обойтись и без крупных белковых насадок, но в этом случае необходимо в качестве маркера выбирать флуоресцентные метки, а атомно-силовой микроскоп заменять на оптический ближнепольный. Предприняты также попытки картирования методом АСМ нуклеотидного полиморфизма, играющего большое значение в возникновении гетерогенности популяций и являющегося причиной ряда генетических патологий. В то же время вариант маркирования с использованием АСМ не является уникальным, это своеобразный аналог создания рестрикционных карт с использованием ферментов рестриктаз. Для картирования можно сочетать оба метода, хотя справедливости ради нужно отметить, что сейчас существуют и более быстрые методы определения последовательностей нуклеотидных оснований.

А вот следующий тип исследований, который предлагает атомно-силовая микроскопия, является уникальным и не может быть реализован ни одним другим методом. Речь идет об измерении силы взаимодействия между двумя комплементарными цепями ДНК. Если к зонду «химически пришить» одну олигомерную цепочку ДНК, а на подложке прочно иммобилизовать антипараллельные олигонуклеотиды, то, опуская зонд, можно добиться образования комплементарных связей (рис. 3.7).



Впоследствии при отведении зонда наличие водородных связей между комплементарными основаниями будет требовать применение дополнительной силы для отведения зонда, а движения кантилевера будут регистрироваться в форме пиков. Это отличная система для регистрации как единичных, так и множественных связей в молекуле ДНК. Она может быть использована в качестве модели для измерения термостабильности отдельных связей, изучения нуклеотидного полиморфизма и мутаций. В медицине метод может быть рекомендован для создания высокочувствительных и специфичных ДНК-чипов.

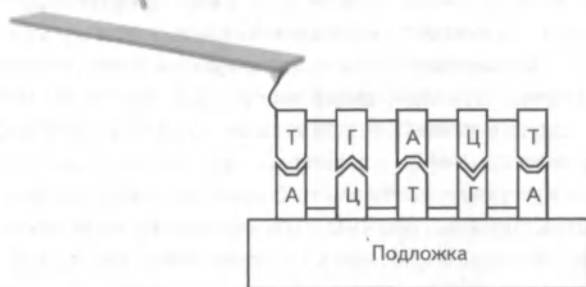


Рис. 3.7. Схема исследования силы взаимодействия между двумя комплементарными молекулами ДНК

Таким образом, атомно-силовая микроскопия в исследовании ДНК может применяться и для качественных, и для количественных оценок. Современные модификации прибора позволяют вести динамические наблюдения за изменениями структуры и функций молекулы. Новые направления исследований позволяют создавать перспективные диагностические системы.

### 3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСОВ

Исследование вирусов имеет большое значение и для биологии, и для медицины. Вирусы, несомненно, играют огромную роль в популяционных соотношениях живых организмов. Несколько лет назад была достаточно популярной теория, рассматривающая вирусы в качестве движущей силы естественного отбора. Не обсуждая «за» и «против» этой теории, можно заметить, что однозначным явля-



ется факт заполнения ниши, освобожденной бактериальными клетками вирусными инфекциями (количество бактериальных инфекций снизилось благодаря применению антибиотиков). Сейчас практически не наблюдается бактериальных эпидемий, в то время как эпидемии (и даже пандемии) вирусных инфекций отмечаются ежегодно. Важно рассматривать вирусы с точки зрения поиска мишеней для разработки специфических противовирусных препаратов, изучать их вакцинальные штаммы. Важным направлением является разработка и внедрение качественных диагностикумов (с высокой чувствительностью, воспроизводимостью и специфичностью). В то же время в связи с прогрессом нанотехнологии появилась новая стратегия практического использования вирусов — в качестве наноконтейнеров для адресной доставки лекарств. Не менее интересным является использование вирусного капсида в качестве своеобразного нанореактора, где каталитические процессы проходят в жестко ограниченном объеме.

Архитектоника и размеры вирусных частиц чрезвычайно разнообразны. Но в то же время все вирусные частицы симметричны. Основные типы симметрии: спиральный, кубический, смешанный. Наличие четкой симметричной формы делает вирусные частицы очень удобным объектом для АСМ-микроскопии.

Известно, что вирусы могут существовать в двух формах: вирион и внутриклеточная репликативная форма. Вирусы относятся к облигатным внутриклеточным паразитам, т. е. размножаться (увеличивать количество своих копий) они могут только внутри клетки-хозяина. Клеткой-хозяином для вируса может являться бактерия (такие вирусы носят названия бактериофагов), растительные и животные клетки\*. Соответственно вирусы можно наблюдать в форме вириона, сорбированного на поверхности подложки, адсорбированного на клетке, почкующегося через клеточную мембрану. Поскольку атомно-силовая микроскопия дает возможность исследования только поверхности, внутриклеточную репликативную стадию жизнедеятельности вируса увидеть нельзя. Зато можно визуализировать вирусную частицу не разрушая ее, а рассматривая вирусы в жидкости, можно избежать артефактов, возникающих при их фиксации, сложной обработке и исследовании частиц в воздушной среде. Кроме того, предоставляются возможности определения механических

---

\* Клетка, чувствительная к заражению вирусом и экспрессирующая на своей поверхности рецепторы для адсорбции вирусных частиц, называется перmissive.





свойств отдельных компонентов вирусной частицы (нуклеиновой кислоты, капсида, суперкапсида), а также всей вирусной частицы. В отдельных экспериментах можно моделировать процесс самосборки вирусных частиц.

Строгих ограничений для нанесения на подложку оболочечных и безоболочечных вирусов\* не существует. Хотя в том случае, если основной задачей исследования является изучение капсида оболочечных вирусов, суперкапсид удаляют, обрабатывая вирусные частицы неионными детергентами (например, тритоном X-100). Для более глубокого «раздевания» вируса и высвобождения нуклеиновой кислоты можно использовать додецилсульфат натрия, мочевины, диметилсульфоксид и/или набор протеолитических ферментов. Для иммобилизации вирионов применяются те же подложки, что и для белка или нуклеиновых кислот (пиролитический графит, слюда, стекло, поливинилхлорид и т. д.). Можно добиваться физической адсорбции вирусов на поверхности (например, на свежесколотой слюде) или модифицировать поверхность (пиролитический графит, стекло) для лучшей адсорбции вирусов поли-L-лизинном (рис. 3.8).

Как и в случае с бактериями, суспензию, содержащую вирусы, наносят на подложку, и через некоторое время наблюдается специфическая сорбция вирионов на субстрате. Время наступления достаточно прочной адсорбции будет зависеть от типа подложки и размера вирусных частиц (может варьироваться от 20 до 60 мин). Плотность суспензии не должна превышать  $10^9$ – $10^{10}$  вирион/мл. В том случае, если планируется наблюдение за вирусными частицами в воздушной среде, необходимо после того, как сорбция произошла, несколько раз аккуратно промыть образец дистиллированной водой. Если планируется изучение вирионов в жидкости (буферы разного состава), то можно использовать и физическую адсорбцию, и химическую модификацию поверхности (например, аминокруппами), приводящую к прочной ковалентной иммобилизации белков капсида (или суперкапсида) на подложке. Иногда для образования

---

\* Все вирусы по принципу наличия суперкапсида делятся на оболочечные (сложные) и безоболочечные (простые). Безоболочечные представляют собой нуклеиновую кислоту, покрытую белковым капсидом, состоящим из отдельных белковых субъединиц — капсомеров, оболочечные вирусы покрыты сверху суперкапсидом, представляющим собой бислой липидов (который вирус получает, почкуясь через ядерную или цитоплазматическую мембрану клетки), в который встроены вирусспецифические белки. Особую структуру имеют бактериофаги.





перекрестных связей между молекулами функционализированной поверхности и вирусом прибегают к фотоактивации поверхности. К ковалентному связыванию обращаются в том случае, если необходимо исследовать силы взаимодействия (например, вирус, фиксированный на поверхности, выступает в качестве антигена, тогда зонд функционализируется привязкой антитела).

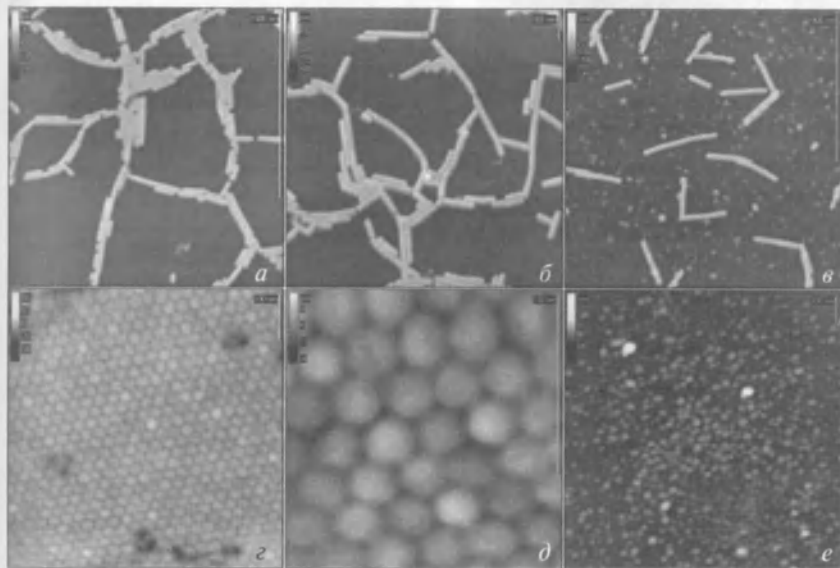


Рис. 3.8. АСМ-изображения:

*a* — *Poa* полудатентный вирус (PSLV); *б* — мозаичный вирус ячменя (BSMV); *в* — вирус табачной мозаики (TMV); *з, д* — *Brome mosaic virus* (BMV), поражает растение *Bromus inermis* (костер), семейства мятликовых; *е* — альфа-альфа мозаичный вирус (AMV).

Изображение перепечатано с «Nanomedicine» (2007) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

К настоящему времени методом АСМ исследована архитектура большого числа вирусных частиц, паразитирующих на клетках разных хозяев: вирус шарки сливы (Сафенкова И.В. и др., 2010); вирус мозаики огурца и репы (Malkin A. et al., 2005; Kuznetsov Yu.G., McPherson A., 2006); вирус А картофеля (Obraztsova E.A. et al., 2008); вирус табачной мозаики (Drygin Y.F. et al., 1999) — из вирусов растений; вирус простого герпеса 1 типа (Malkin A. et al., 2005); вирус



иммунодефицита человека (Kuznetsov Yu.G. et al., 2004) вирус осповакцины (Malkin A. et al., 2003) — из вирусов человека; вирус лейкемии мышей (Kuznetsov Yu.G. et al., 2004) — из вирусов животных; бактериофаги (Dubrovín E.V. et al., 2008) — из вирусов бактерий (рис. 3.9) и т. д.

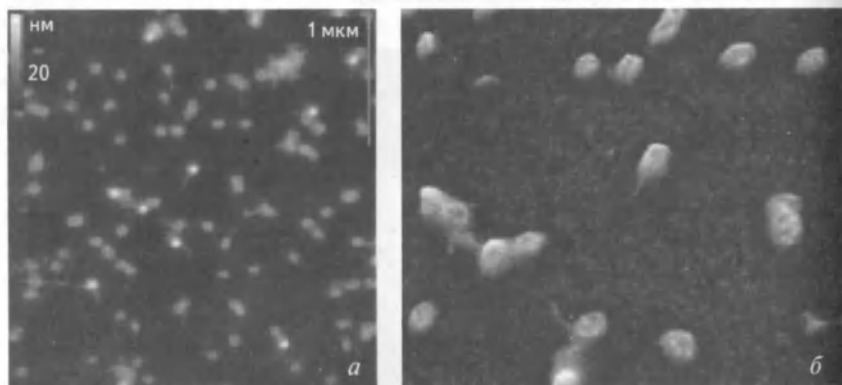


Рис. 3.9. А 157 бактериофаг *E. coli* исследован методом АСМ в резонансном режиме сканирования:

*a* — размеры скана  $3 \times 3$  мкм; *б* — размеры скана  $600 \times 600 \times 60$  нм.

Изображение перепечатано с «Langmuir» (2008) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

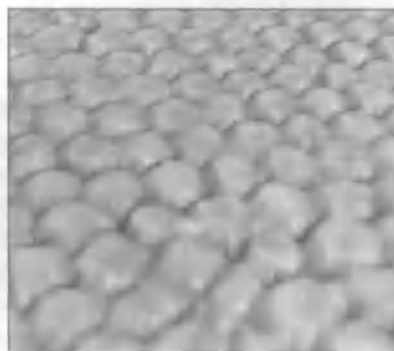
АСМ предоставляет ценную морфологическую информацию, в частности позволяет с нанометровой (иногда даже ангстремной) точностью определять размеры капсомеров, исследовать их субструктуру, а также ориентироваться во взаимном расположении и компактности (плотности) укладки. Сейчас накоплен достаточно большой статистический материал по размерам вирусных частиц. В случае стабильных вирионов ими даже можно калибровать атомно-силовой микроскоп для биологических исследований. Создание библиотек АСМ-изображений вирусов является перспективным для разработки в будущем новых принципов систематизации и диагностики.

Для получения комплексных данных используют сопоставление результатов, полученных методами АСМ и электронной микроскопии. В частности, сочетание методов электронной и атомно-силовой микроскопии позволило выявить у вируса томата X фактор стабильности вирусной частицы. Связывание вириона с внутриклеточ-



ными белками движения (это вирусиндуцированные белки, синтезирующиеся внутри клеток растений и способствующие передаче генетической информации вируса между соседними клетками) приводит к разборке вирусного капсида.

Интересным направлением является исследование агрегации вирусных частиц. Например, можно рассматривать в режиме реального времени рост кристаллов вирусов, когда две-три вирусные частицы становятся центрами кристаллообразования, а вокруг них формируется структура, напоминающая стог сена. На рис. 3.10 представлено 3D-изображение кристаллической структуры *Brome mosaic virus* (BMV). Высокоразрешающая АСМ-микроскопия позволяет установить период этого кристалла (около 28 нм). Важным морфологическим направлением АСМ-микроскопии является идентификация разных пространственных форм вирусов (например, вирус гепатита В имеет две конфигурации).



**Рис. 3.10.** АСМ-изображение *Brome mosaic virus* (BMV) с высоким разрешением. Размеры скана  $300 \times 300 \times 5$  нм. Изображение перепечатано с «Nanomedicine» (2007) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

Проводятся серии экспериментов по определению влияния внешних факторов (рН, разный состав изо-, гипер- и гипосмотических буферов) на структуру (архитектонику) вирионов и их свойства (адгезию, механическую прочность и т. д.). Особенно важно пытаться воссоздать среду, с которой вирион сталкивается внутри клетки-хозяина. Например, для риновируса 2 показано, что при снижении рН (от 7,6 до 4,1) наблюдается его «раздевание» с высвобождением молекулы РНК, т. е. смоделирована ситуация внутриклеточного паразитизма: вирус в клетке попадает в эндосому, где кислая среда вызывает диссоциацию комплекса «нуклеиновая кислота—белок». Применение дополнительных режимов позволяет получать новую информацию о структурных особенностях вирионов. Например, режим фазового контраста позволил исследовать локальную эластич-



ность отдельных структурных элементов бактериофагов (головки, шейки, хвостики).

Сдавливая зондом цельный вирион, можно определить механическую прочность вирусной частицы. При этом будут получаться прямые данные в отличие от косвенной методики осмотического шока, используемой ранее. Например, для вируса табачной мозаики установлено, что сжатие частицы на 18 нм требует прижатия зонда с силой 1 МПа, а при увеличении давления до 40 МПа будет отмечаться необратимое разрушение вирусной частицы.

Можно произвести нанодиссекцию достаточно аккуратно: в этом случае зондом нужно провести много раз по одной и той же линии с определенной силой прижатия. Тогда одна длинная вирусная частица будет разрезана на две короткие. Такие манипуляции лучше всего проводить с вирусами, имеющими спиральный тип симметрии. Над полученными фрагментами вириона можно производить самые разные действия: изгибать, переносить и поворачивать их на разные углы на поверхности подложки. Такие исследования позволяют лучше понять механические свойства вирусных частиц, определяя латеральные силы взаимодействия между частью вирусной частицы и подложкой. Однако этот метод, представляющий несомненный интерес в реализации нанохирургии на уровне отдельной вирусной частицы, не прижился в качестве метода определения механической прочности.

Рассчитывать жесткость вирусных частиц все исследовательские группы предпочитают, используя метод FS-спектроскопии. В частности, установлено, что вирусы являются одной из наиболее прочных природных частиц. Например, исследования жесткости головки бактериофага Ф29 без молекулы ДНК внутри показало значение 1,8 ГПа, что соответствует жесткости пластика. Эта особенность обусловлена тем, что в крайне ограниченном объеме должно быть запаковано достаточно много генетического материала, поэтому упаковка нуклеиновой кислоты осуществляется с плотностью, близкой к кристаллической. Это создает внутреннее давление в несколько десятков атмосфер (порядка 60 атмосфер). Вместе с тем прочно уложенные капсомеры не только противостоят высокому внутреннему давлению, но и надежно защищают генетический материал вируса от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Для подавляющего большинства вирусных частиц отмечено, что «пустой» вирион (не содержащий ДНК или РНК) обнаруживает при проведении FS-спектроскопии большую мягкость, чем вирусная части-



ца в ее нативном состоянии. В целом эксперименты по сравнению механических свойств вирусных частиц с генетическим материалом и без него позволили получить массу полезных сведений об укладке ДНК (или РНК) в вирионе, о значении гидратных оболочек молекул в этих процессах. Кроме того, было установлено, насколько сильно влияет на механические процессы и устойчивость вирусных частиц наличие или отсутствие связи ДНК (или РНК) со структурными белками вириона.

Благодаря методу АСМ-микроскопии удалось установить, что и жесткость, и плотность вирусной частицы во время созревания значительно изменяются. У зрелой вирусной частицы жесткость меньше, чем у созревающей, и при одинаковых размерах внешнего радиуса вирусной частицы внутренний радиус уменьшается при созревании приблизительно на 16 нм (эксперименты проводились на вирусе лейкемии). Снижение ригидности вирусной частицы при созревании способствует ее более легкому проникновению в клетку-мишень. Если, напротив, вызвать точечную мутацию в ДНК или РНК вирусов, изменяющую структуру протеинов капсида, то это приводит к увеличению прочности связывания между ними. Поэтому диссоциации белков в средах с низкими значениями pH не происходит, и начальный этап реализации вирусной инфекции (разделение вириона) срывается. Измерение жесткости вирусной частицы с мутантными капсомерами методом FS-спектроскопии показало, что ригидность вириона в этом случае увеличивается на 30—40 %. Обратный эффект — значительное снижение ригидности созревающей вирусной частицы отмечено для оболочечных ретровирусов, у которых снижали общее количество белков в суперкапсиде. В то же время изменение количества суперкапсидных протеинов созревшей вирусной частицы никак не отражалось на ее жесткости. Эти эксперименты имеют большое практическое значение, т. е. доказывают, что проведение разнообразных манипуляций с геномом, использование генной инженерии позволяют целенаправленно изменять механические и структурные свойства капсида в желательном направлении. В свою очередь это может практически использоваться при конструировании вирусных систем адресной доставки лекарственных веществ или генетической информации к клеткам-мишеням.

Хотя нужно отметить, что не всегда изменение структуры ведет к изменению механических свойств. В частности, для вируса гепатита В отмечено наличие двух различных структурных форм, но



жесткость вирионов этих форм абсолютно идентична. Большие наработки в области измерения прочности вирусных частиц, а также учитывая значимость механики в реализации репродуктивного цикла вирусов, в геной инженерии и молекулярной биологии позволило создать новое направление исследований — физическую вирусологию (Baclayon M. et al., 2010).

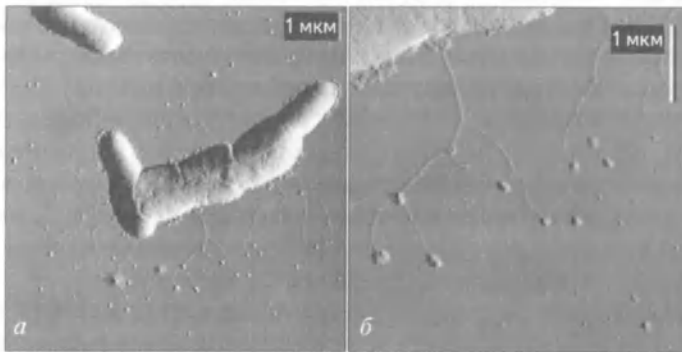
Метод АСМ применяют в качестве молекулярного конструктора, позволяющего воспроизводить процессы самосборки, протекающие в живых системах. В частности, команда М.-Г. Трина (Trinh M.-H. et al., 2010) продемонстрировала это, используя АСМ для сборки и контроля процесса сборки вируса табачной мозаики. В исследованиях можно двигаться и обратным путем: методом АСМ удалять отдельные капсомеры и следить, каким образом это отражается на механических свойствах целого вириона (Roos W.H. et al., 2010). Таким образом, в исследовании процесса самосборки вирусных частиц можно руководствоваться обеими моделями нанотехнологии: сборка сверху вниз и снизу вверх. В целом можно наблюдать сборку, разборку и реорганизацию вирусных частиц. Удаляя отдельные капсомеры, следует помнить о том, что они являются лигандами для рецепторов, экспрессированных на поверхности перmissive клеток, поэтому белки можно рассматривать и отдельно, определяя для них силу аффинного взаимодействия. Точно так же выделение вирусной ДНК позволяет исследовать ее изолированно.

Одним из наиболее перспективных направлений использования АСМ в вирусологии является определение взаимодействия вирусов с клетками-мишенями. Первоначальные эксперименты, основанные на несовершенной технике АСМ-микроскопии, базировались только на сравнении изображений клеток-мишеней до (контроль) и после (опыт) инкубации их с вирионами. Эти эксперименты проводились с разными вирусными частицами и на разных клеточных культурах. Уже в этих экспериментах удалось обнаружить процесс почкования вируса через мембрану клетки-мишени и даже отследить кинетику этого процесса. Совершенствование методики и перенос наблюдения на живые клетки позволил установить, что при почковании (выходе вирусов из клетки) наблюдается две субпопуляции вирусных частиц. Первая субпопуляция «быстрая» составляет 25 % всех почкующихся частиц и покидает клетку за 25 мин, другая — «медленная». Для нее процесс почкования составляет 45 мин, а задержка в росте наблюдается в самом конце процесса перед отделением вирусной частицы от



клетки и связана она с «энергетическим барьером» клетки. Для вирионов отмечается еще одна интересная особенность — почкование каждый раз происходит в строго определенном месте, но никогда две разные вирусные частицы не могут выйти через один и тот же участок клеточной мембраны. Естественно, такие наблюдения стали возможны только благодаря применению АСМ в режиме реального времени. Применение сканирования с большой силой, вызывающего «продавливание» мембраны, выявило, что актиновый цитоскелет, образующий внутреннюю сеть, принимает самое активное участие в процессе самосборки и почкования вирусных частиц.

Не менее интересным является процесс взаимодействия бактериофагов с бактериальными клетками. Исследования в режиме реального времени позволяют устанавливать особенности специфического взаимодействия вирусов с бактериями и рассматривать кинетику этого процесса. Например, на рис. 3.11 выявлен интересный факт первоначального связывания бактериофага не только с соматическим (О) антигеном, но и со жгутиковым (Н) антигеном *Salmonella enteritidis* 89, а на рис. 3.12 отображена важность соблюдения определенных внешних условий культивирования бактериофагов с чувствительными к ним микроорганизмами.



**Рис. 3.11.** Сорбция бактериофага 39 на поверхности и на жгутиках *Salmonella enteritidis* 89 исследована методом АСМ в контактном режиме:

*а, б* — взаимодействие *S. enteritidis* 89 с фагом 39 через 5 мин после начала инкубации с бактериофагом при 37 °С. Изображения представлены в разном масштабе.

Изображение перепечатано с «Langmuir» (2008) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина



Рис. 3.12. *Bacillus thuringiensis* 393:

*a* — контроль-изображение бактерии до взаимодействия с бактериофагом, полученное в контактном режиме; *б* — происходит только сорбция, но не пенетрация в бактериальную клетку специфического фага  $V_f$  при инкубации в отсутствие кислорода (2 ч, 30 °C); *в* — связывание с поверхностью бактерии и проникновение в нее фага  $V_f$  через 5 мин после начала инкубации при оптимальных условиях культивирования (аэрация, 30 °C, при постоянном встряхивании).

Изображение перепечатано с «Langmuir» (2008) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

При проникновении в клетку бактериофаг M13, поражающий *Escherichia coli*, вызывает сглаживание поверхности, а проведение FS-спектроскопии, говорит о резком снижении жесткости клеточной стенки. Сочетание с другими методами исследования дает возможность в этом случае говорить о разрушении липополисахарида. При увеличении времени совместной инкубации бактериофагов с чувствительными к ним бактериями приводит к полному бактериолизу, с дезинтеграцией клеточной стенки. Специфичные литические фаги дезинтегрируют клеточную стенку и грамположительных, и грамотрицательных микроорганизмов. На рис. 3.13 проиллюстрировано постадийное взаимодействие бактериофага A 157 с *E. coli*, а на рис. 3.14 отражено высвобождение из бактериальной клетки новой порции репродуцированных бактериофагов.

Таким образом, исследования вирусных частиц является одним из приоритетных направлений атомно-силовой микроскопии. В этой области отмечаются весьма существенные результаты, связанные с изучением структуры, активности вирусных частиц, из механических свойств, вариантов взаимодействия с клетками-мишенями. Большое внимание уделяется процессам моделирования, позволяющим целенаправленно изменять отдельные компоненты вирусной частицы и регулировать процессы взаимодействия с клетками-мишенями.



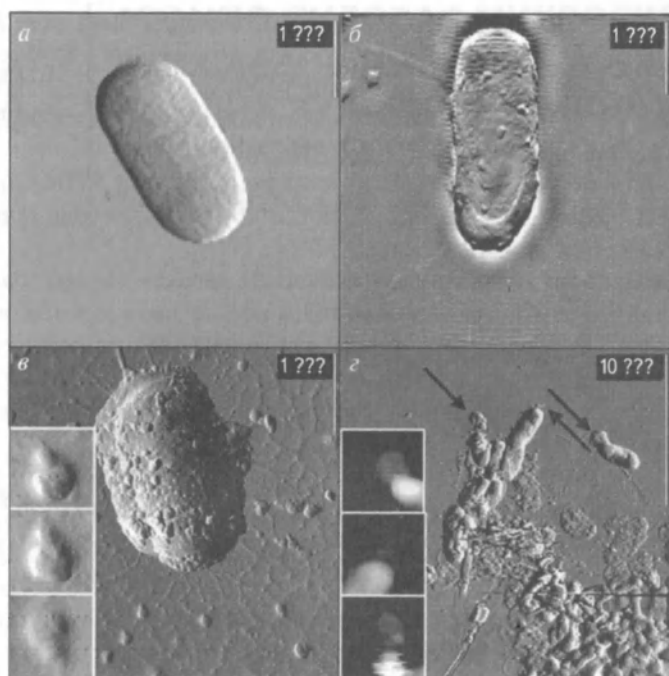
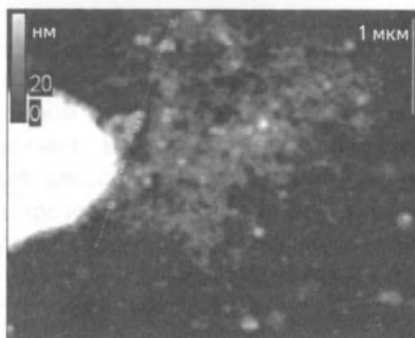


Рис. 3.13. Лизис *E. coli* O57 бактериофагом А 157 исследован методом АСМ в контактном режиме:

а — *E. coli* до взаимодействия с бактериофагом; б — *E. coli* через 5 мин после инкубации с бактериофагом при 37 °С; в — через 30 мин после начала взаимодействия (на встроенных рисунках представлено увеличенное изображение бактериофагов); г — бактериолиз через 60 мин после начала взаимодействия фага с бактериальной клеткой.

Изображения перепечатаны с «Langmuir» (2008) с любезного согласия д-ра Е.В. Дубровина

Рис. 3.14. Высвобождение нового поколения бактериофага  $V_f$  из *B. thuringiensis* 393 через 60 мин после начала совместной инкубации при оптимальных условиях (аэрация, 30 °С, при постоянном встряхивании)





Вместе с тем многие вопросы остаются открытыми.

1. Каким образом отражается процесс созревания вирусной частицы на ее структурно-механических свойствах?

2. Как может повлиять стресс (осмотический, механический и т. д.) на процесс сборки/разборки вирусных частиц?

3. Каким образом происходит укладка ДНК или РНК вирусной частицы и какие факторы оказываются критичными для формирования окончательной укладки?

4. Как сильно меняются механические характеристики бактериальной клетки после проникновения в нее не литического, а лизогенного фага и вообще как отражается виrogenия на структурных, функциональных и механических свойствах клетки-хозяина?

5. Как можно повлиять на процессы взаимодействия между вирусной частицей и клеткой-мишенью?

6. Какая математическая модель расчета конфигурации вирусной частицы в разных средах является наиболее адекватной?

Быстрые темпы развития АСМ позволяют надеяться, что ответы на большинство этих вопросов будут получены в ближайшее время.

#### 4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микробиологи, работающие с бактериальными культурами, постоянно сталкиваются с проблемой вариабельности. Микроорганизмы, не только принадлежащие одному виду, но и даже одному штамму\*, могут весьма существенно изменять внешний вид в зависимости от многих факторов, прежде всего от условий окружающей среды (рис. 4.1).

Изменения клеток происходят и при культивировании: длительное культивирование на среде, многочисленные пассажы, перенос на новую питательную среду — все эти факторы отражаются на клеточной морфологии. Для некоторых микроорганизмов (микоплазмы, хламидии и т. д.) плеоморфизм является одной из основных характеристик. Важность исследования поверхности бактериальных клеток связана еще и с тем, что многие патогенные свойства бактерий ассоциированы именно с поверхностными структурами (разные классы адгезинов, наличие капсулы, белок М *Streptococcus pyogenus*, белок А *Staphylococcus aureus* и т. д.).

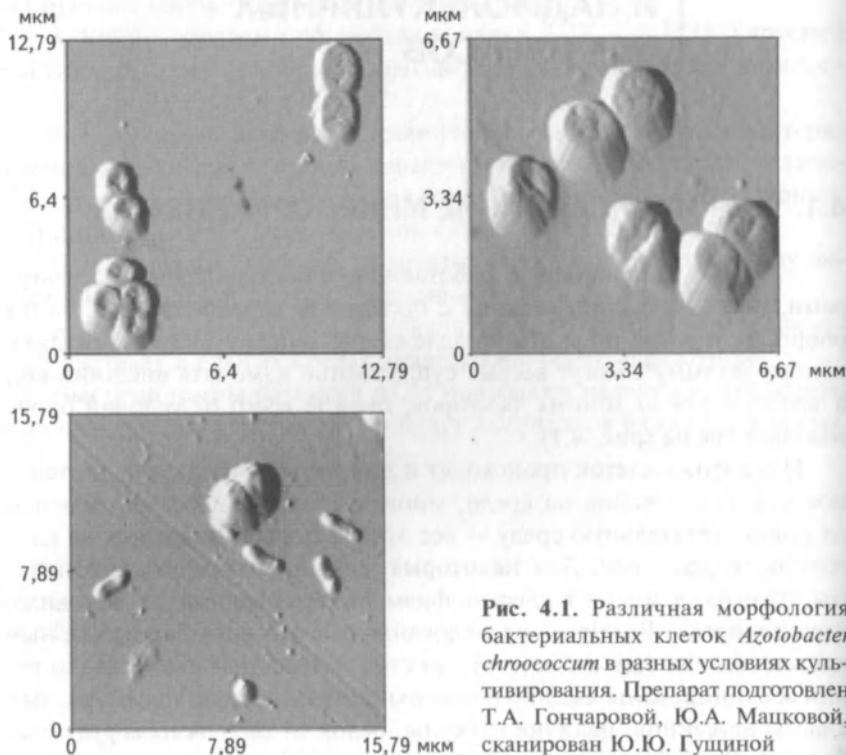
Оптическая микроскопия не дает того разрешения, которое позволяло бы уловить тонкие структурные перестройки клеточных стенок. Поэтому возможности атомно-силовой микроскопии передавать изображение бактериальной клеточной стенки с высоким разрешением оказались столь востребованными. Высокое разрешение метода используется в спорных случаях классификации (например, для определения принадлежности к определенному виду). Это направление особенно актуально для идентификации микрофлоры из ма-

---

\* Штамм — совокупность микроорганизмов одного вида, выделенных из разных источников либо из одного и того же источника в разное время.



лоисследованных источников (мировой океан, высокие слои атмосферы и т. д.), а также в случае работы с некультивируемыми микроорганизмами (спирохеты, хламидии, риккетсии и т. д.) (Ciancio A. et al., 2004).



**Рис. 4.1.** Различная морфология бактериальных клеток *Azotobacter chroococcum* в разных условиях культивирования. Препарат подготовлен Т.А. Гончаровой, Ю.А. Мацковой, сканирован Ю.Ю. Гушиной

Неоценимый бонус, предоставленный методом, — возможность определения эластичности поверхностных структур (капсулы, клеточной стенки, мембран сферопластов и протопластов), а также возможность отслеживать изменения бактерий в режиме реального времени. Помимо визуализации живых бактериальных клеток метод АСМ позволил исследовать молекулярные (гидрофобные и электростатические) взаимодействия на поверхности, картировать физико-химические свойства, измерять жесткость компонентов клеточной стенки и адгезию клеточных структур, а также степень натяжения поверхностных макромолекул.



Направления исследований не ограничиваются областями микробиологии, таксономики и медицины. Интересное развитие метод получил в изучении взаимодействия бактерий с минералами, детализации механизмов запуска и развития процессов биodeградации органических и минеральных компонентов, биокоррозии. Прорыв в этих направлениях связан со способностью АСМ-микроскопии определять одномоментные силы взаимодействия между поверхностью минерала (или металла) и микроорганизмом, а также оценивать динамику изменения этих сил во времени. Модификация метода, где на зонд фиксируется бактериальная клетка, а подложка представлена минералом или металлом, называется бактериально-силовой микроскопией (БСМ). БСМ в сочетании с рядом рутинных методов (спектроскопия, флуоресцентная микроскопия и т. д.) в области геомикробиологии позволила ответить на следующие вопросы:

1. Способны ли бактерии распознавать отдельные части минералов или кристаллографическую ориентацию?
2. Способны ли бактерии менять аффинность связи с минералами или металлами в анаэробных или олиготрофных условиях?
3. Как влияет межклеточное взаимодействие на формирование биопленок?
4. Каким образом на прикрепление и отрыв бактерий от субстрата влияют силы межмолекулярного взаимодействия (электростатические, ван-дер-ваальсовы, гидратные, гидрофобные, энтропийные)?
5. Каким образом перестраиваются адгезины на поверхности бактерий при адгезии на минеральном субстрате или металле, какие условия требуются, чтобы процесс адгезии оказался успешным?
6. Насколько повреждается поверхность самой бактерии после ее адгезии на неорганическом субстрате? Экспрессию каких генов запускает такая адгезия? И если меняется экспрессионный профиль, то как много времени необходимо для синтеза белков или экстрацеллюлярных полисахаридов?
7. Как меняется конформация белков-адгезинов при движении электронов?
8. Каким образом изменяется структура самого субстрата (минерала или металла) после взаимодействия с микроорганизмами (Lower S.K. et al., 2001)?

Первоначально, при АСМ-исследованиях использовали сканирование клеток в воздушной среде. Например, в работе И.В. Яминского и др. (1997) исследуются штаммы *E.coli*, которые фиксировали



к поверхности подложки путем естественного высыхания. Такой способ фиксации позволил выявить четкие изменения морфологии поверхности штамма *Escherichia coli* после наследования и экспрессии *gfb*-гена от *Shigella flexneri*. Аналогичным исследованиям посвящена работа Е.В. Бессмельцевой и др. (2003): обнаружено изменение морфологии клеток *E. coli* (увеличение размеров и изменение глобулярной структуры) после трансфекции плазмидами. В приведенных примерах изменения морфологии бактериальных клеток ассоциированы с изменениями генома. Многие работы посвящались исследованию бактерий, имеющих широкое практическое применение. В частности, на рис. 4.2 представлены изображения эубиотиков, применяющихся в клинической практике для лечения дисбактериозов, а на рис. 4.3 — изображение азотобактера, который выступает в качестве симбионта растений семейства бобовых, способен фиксировать азот воздуха и поэтому активно применяется в сельскохозяйственной практике.

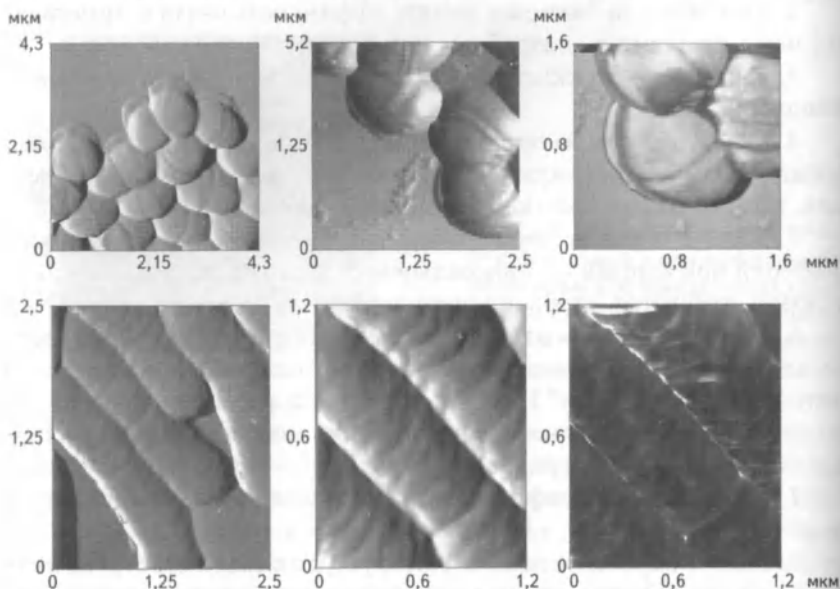


Рис. 4.2. АСМ-изображения эубиотиков, применяемых в клинической практике для лечения дисбактериозов. Верхняя линейка — бифидум-бактерии *Bifidobacterium bifidum*, нижняя линейка — лактобактерии *Lactobacillus lactis*. Препарат подготовлен К.Я. Соколовой, сканирован Ю.Ю. Гущиной



Атомно-силовая микроскопия позволяет исследовать также поверхностно-активные свойства ряда гликопептидов и липопептидов (например, *Bacillus subtilis*) и проецировать эти свойства на антибактериальную и противовирусную активность (Delui M. et al., 1999).

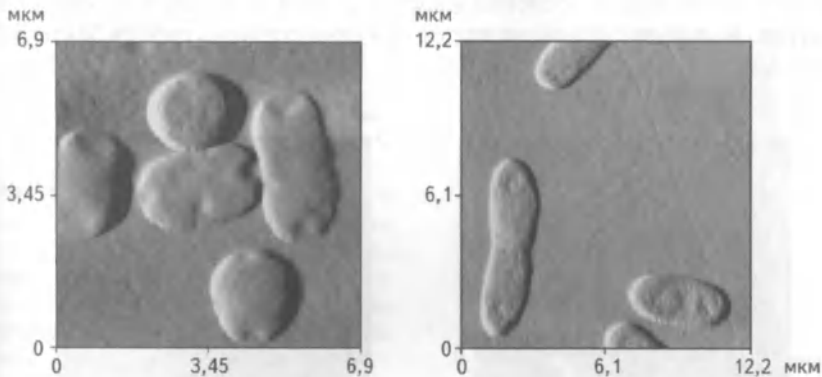


Рис. 4.3. Бактерии рода *Azotobacter*, выступающие в качестве симбионта бобовых растений. Препарат подготовлен А.А. Алексеевой, сканирован Ю.Ю. Гушиной

Большое количество работ посвящено и влиянию внешних, экзогенных, в том числе повреждающих, факторов, на клеточную стенку и мембрану бактерий. Например, в работе Д.Дж. Мюллера (Müller D.J. et al., 1999) благодаря атомно-силовой микроскопии удалось наблюдать за изменением конформации белков-поринов. После приложения высокого трансмембранного потенциала или уменьшения рН среды экстрацеллюлярная петля белков, образующих каналы, опускалась в глубь отверстия канала, т. е. канал закрывался. Таким образом, авторами был описан один из механизмов защиты *E. coli* от внешних воздействий (высокого потенциала и кислой реакции среды) и высказано предположение, что *E. coli* выживает в кислой среде желудка именно благодаря этому механизму. Подобные изменения конформации белков-поринов были зафиксированы для *Deinococcus radiodurans*, поглощающей одни молекулы и отсеивающей другие (Müller D.J. et al., 1996). Локальные перестройки, связанные с работой ионных каналов, возникают как защитная реакция бактериальной клетки в том случае, если действующий фактор не превышает некоторого порогового значения. В случае воздействия заведомо повреждающих факторов, например высоких кон-



центраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в клеточной стенке бактерий образуются микропоры\*. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что диаметр этих пор составляет 30 нм. Альтерация (повреждение) и гибель бактериальных клеток наблюдается также при нормальной работе механизмов неспецифической резистентности\*\* макроорганизма. В качестве примера на рис. 4.4 представлена гибель бактерий *Micrococcus lysodecticus*.

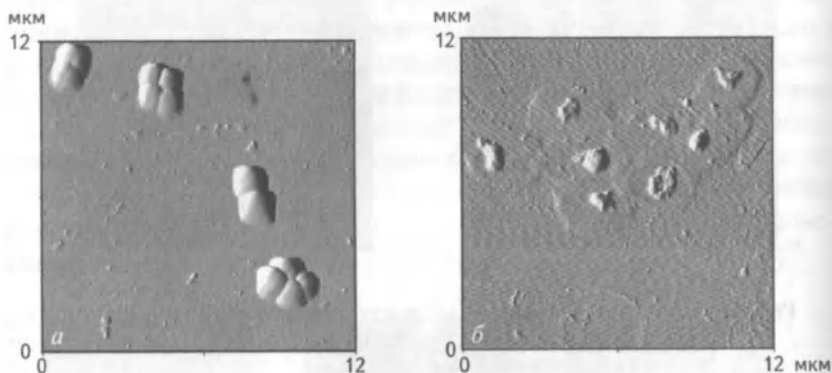


Рис. 4.4. Штамм *Micrococcus lysodecticus* фиксирован высыханием и сканирован в воздушной среде:

*a* — видны агрегированные клетки, имеющие четко очерченные границы. Размеры клеток составляют 1,3—1,5 мкм в диаметре, высота клетки 0,5—0,6 мкм; *б* — изображение *Micrococcus lysodecticus* после инкубации со слюной здорового ребенка. Видны клетки в разной степени разрушения, окруженные слюной. Размеры не полностью разрушенных клеток сильно изменены: диаметр 0,6—0,8, высота 0,1—0,15 мкм

Так, используя атомно-силовую микроскопию, можно исследовать активность работы естественных факторов защиты организма, которые направлены на уничтожение бактериальной микрофлоры. Можно даже оценивать состоятельность системы неспецифической

\* Этот метод обработки раствором  $\text{CaCl}_2$  используется в генетической инженерии для индукции компетентности бактериальной клетки при проведении трансформации векторными плазмидами.

\*\* Неспецифическая резистентность объединяет широкий набор врожденных факторов защиты, которые подключаются к защите организма до активации специфического иммунного ответа. Примерами клеточных факторов неспецифической резистентности являются нейтрофилы, натуральные киллеры и т. д., гуморальных — лизоцим, муцины слюны, белки системы комплемента, интерлейкины и т. д.



резистентности. На рис. 4.5 представлен скан того же микроорганизма, но инкубированного со слюной ребенка, имеющего нарушения местного иммунитета полости рта, связанные с тяжелым кариозным процессом.

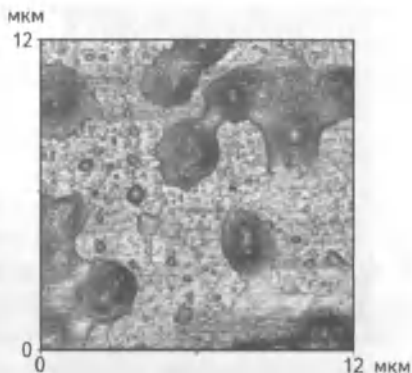


Рис. 4.5. *Micrococcus lysodecticus* после инкубации со слюной ребенка, страдающего декомпенсированной формой кариозного процесса. На данном изображении практически не видно разрушенных клеток. Размеры клеток: диаметр 2,6—4,6; высота 1,3—1,4 мкм

Так же как в случае со слюной здорового ребенка, можно отметить отсутствие агрегатов бактериальных клеток: каждая клетка «обволакивается» слюной. Компьютерный анализ размеров бактериальных клеток до и после обработки лизоцимом слюны показал статистически значимые различия между контролем и опытом и в случае инкубации со слюной здорового ребенка, и при инкубации со слюной ребенка с декомпенсированной формой кариеса. Фактически можно установить и последовательность работы лизоцима, приводящую к гибели бактерий: слюна вначале обволакивает каждую *Micrococcus lysodecticus*, затем происходит набухание клеток и в конце их лизис.

Не менее интересные результаты были получены нами при исследовании активности альтернативного каскада комплемента\*. Было установлено, что в отношении бактерий одного и того же вида может быть задействована принципиально разная защитная стратегия (рис. 4.6, 4.7).

\* Система комплемента — система сывороточных белков, активирующихся в результате реакций ограниченного протеолиза. Играть большую роль в реализации защитных функций сыворотки. Механизмы защиты реализуются в результате трех основных реакций: опсонизации, протеолиза, образования анафилатоксинов. Система комплемента активируется по трем основным механизмам: классическому (для его запуска необходимы иммуноглобулины), альтернативному (запускается полисахаридными структурами бактериальной клетки), лектинозависимому (активируется набором лектиновых структур).



На рис. 4.6 продемонстрировано, что после 60 мин инкубации с белками альтернативного каскада граммотрицательная бактерия\* *Proteus mirabilis* 120 набухает и лизируется.

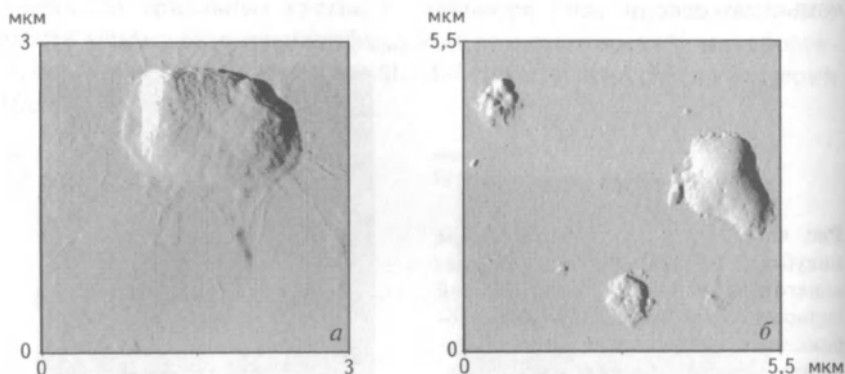


Рис. 4.6. Штамм *Proteus mirabilis* 120:

*a* — клетка без воздействия; *б* — клетки, погибшие (лизированные) в результате формирования мембрано-атакующих комплексов белками системы комплемента (перфорации в наружной мембране вызывают нарушение ионного баланса клетки и гибель бактерий)

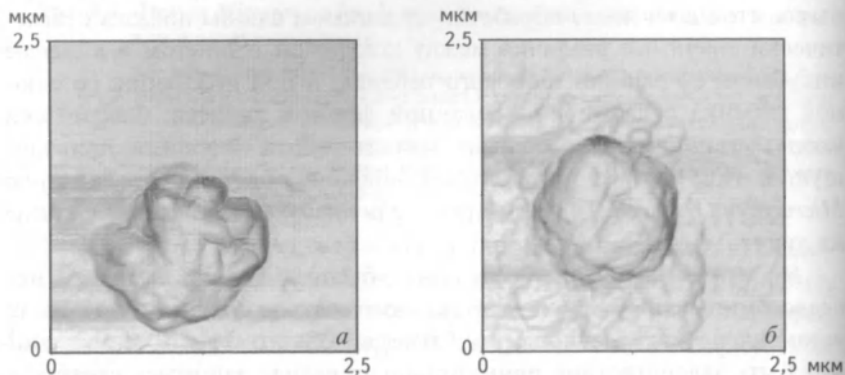


Рис. 4.7. Штамм *Proteus vulgaris* 856:

*a* — клетка без воздействия; *б* — клетка опсонизирована («облеплена») сывороточными белками

\* По особенностям строения клеточной стенки все бактерии принято делить на грамположительные (имеющие толстый слой пептидогликана, и содержащие в клеточной стенке тейхоевые кислоты), граммотрицательные (имеющие снаружи слой липополисахарида) и кислотоустойчивые (имеют особый тип клеточной стенки, богатый липидами и восками).



Другие бактериальные клетки того же вида не лизировались белками комплемента, зато был зафиксирован другой феномен — опсонизация. При опсонизации происходит прочное связывание специальных белков-опсоинов (C3b-, iC3b-белков системы комплемента; иммуноглобулинов Ig G, Ig M) с поверхностью бактерий, что служит своеобразной меткой для быстрого поглощения (фагоцитоза) возбудителей специализированными клетками — фагоцитами. После такого поглощения наблюдается быстрое переваривание бактерий.

Таким образом, АСМ позволяет исследовать не только степень выраженности, но и механизм реализации защитных реакций.

Однако наиболее выигрышным является сканирование бактериальных клеток в жидкости. И если в 1990-х годах АСМ апробировалась преимущественно на фиксированных объектах, монослоях и отдельных молекулах, то 2000-е годы появляется масса работ, где рассматриваются живые бактериальные клетки. Именно исследование в жидких средах без фиксации позволяет рассматривать динамику клеточного роста, размножения бактерий и грибов (например, амитоз и почкование), изменения морфологии при внешнем воздействии (например, обработке ферментами, антибиотиками, антисептиками). Получены изображения микроорганизмов в естественной для них среде для: диатомовых водорослей *Pinnularia viridis* (Crawford S.A. et al., 2001), кисломолочных бактерий (Schaer-Zammaretti R. et al., 2003), спор различных штаммов *Bacillus* (Chada V.G.R. et al., 2003), *Staphylococcus aureus*, *E. coli* (Doktycz M.J. et al., 2003), *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosae* (Yao X. et al., 2002). В этих работах внимание сконцентрировано уже не столько на получении изображений клеточной поверхности и оценке ее структурных особенностей, сколько на динамическом наблюдении за процессами роста и деления. В нативной среде можно исследовать не только сами бактерии, но и отдельные факторы их патогенности. В частности, в работе Дж. Янга (Yang J. et al., 1994) исследована структура бинарного токсина\* *Bordetella pertussis* и показано, что она является стабильной как при воздействии достаточно высоких температур (до 60 °C, после 70 °C начинается диссоциация молекулы), так и широкого ранга pH (от 4,5 до 9,5).

\* Большинство экзогенных токсинов патогенных бактерий имеют бинарную структуру: состоят из двух субъединиц. Субъединица В является рецепторной, она отвечает за связывание токсина с рецепторами клетки-мишени. Субъединица А отвечает за токсические (каталитические) свойства молекулы.



В статьях, посвященных исследованиям бактериальных клеток, все авторы отмечают, что работать гораздо проще с грамположительными и спорообразующими бактериями. Трудности при получении изображения грамотрицательных клеток связаны с высокой мягкостью объекта, так как верхний слой микроорганизмов представлен липополисахаридом, имеющим намного более мягкую консистенцию, чем пептидогликан грамположительных бактерий или дипиколиновая кислота спорообразующих форм. Вторая проблема связана с тем, что грамотрицательные бактерии охотнее взаимодействуют с нитридом кремния, из которого изготовлен зонд, чем с поверхностью стекла или слюды, которые выступают в качестве подложки. Эти причины обуславливают появление первыми работ, в которых исследуется поверхность спор и клеток грибов. Именно исследования в жидкой фазе позволили установить наличие на поверхности спор гриба *Phanerochaete chrysosporium* кристаллического слоя наноразмерных, регулярно расположенных палочкоподобных структур (Dufrêne Y.F. et al., 1999). Было обнаружено, что это протениновые структуры, обладающие чрезвычайно высокой стабильностью, поэтому авторами был сделан вывод о том, что именно они отвечают за защиту спор гриба от внешних воздействий. Для клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, напротив, даже при визуализации с высоким разрешением обнаружена достаточно гладкая поверхность, покрытая наружным слоем мананопротеинов (Dufrêne Y.F., 2001). Исследование структуры клеточной стенки грамположительных бактерий (*Lactococcus lactis*) показало, что пептидогликан бактерий образует ровную гладкую поверхность, напоминающую «молекулярное сито». Такая структура необходима для реализации всех функций клеточной стенки: уравнивания внутреннего тургорного давления, избирательного проникновения в бактерию только необходимых элементов, защиты цитоплазмы и цитоплазматической мембраны от внешних воздействий, участия во всех клеточных реакциях (распознавание, адгезия, агрегация). Периодичность связей пептидогликана, обнаруженная методом АСМ, составляет 25 нм. Кроме того, было установлено (в том числе на основе исследования адгезионных свойств бактерий), что на поверхности клеток определяется S-слой, высота которого составляет 11 нм (Dufrêne Y.F., 2004). Обнаружение этого слоя вносит вклад в объяснение формирования резистентности к антибиотикам. Поскольку S-слой является и механическим и химическим препятствием на пути поступления анти-



биотика, кинетика диффузии препарата внутрь бактериальной клетки удлиняется, а терапевтической концентрации, необходимой для подавления роста или гибели бактериальной клетки, не создается.

Весомым преимуществом наблюдения за клетками в режиме реального времени является возможность исследования их реакции на внешние воздействия. Например, наблюдая за поверхностью дрожжей *S. cerevisiae* после добавления в среду протеазы, было показано появление на поверхности клеток быстро увеличивающихся в размере «брешей» диаметром до 500 нм и глубиной около 50 нм, которые отражали разрушение мананопротеинов поверхности дрожжевой клетки (Ahimou F. et al., 2003). Прогревание бактериальных клеток вызывает увеличение ригидности их клеточных стенок (Dague E., 2010). Используя метод создания эластических карт бактериальных клеточных стенок, можно отслеживать, как этот параметр коррелирует с реализацией бактериальных функций (адгезией, выживаемостью, подвижностью). Не менее интересные модификации зафиксированы и для бактериальных клеток, проинкубированных с антибиотиками (Braga P.C., Ricci D., 2003). Было выявлено, что взаимодействие *Bacillus cereus* с даптомицином, *E. coli* с цефадизимом, *Streptococcus pyogenes* и *Helicobacter pylori* с рокитамицином существенно изменяет морфологию бактерий, однако изменения у клеток разных видов проявляются по-разному. В частности, для клеток стрептококка и *H. pylori* зафиксировано существенное увеличение размеров и формирование атипичных кластеров. При увеличении времени инкубации с антибиотиком наблюдают постепенное разрушение бактериальной клетки. У бацилл после четырехчасовой инкубации наблюдается конденсация внутренних структур, что проявляется кластеризацией, но не между бактериальными клетками, как в случае со стрептококком и *Helicobacter pylori*, а чередованием на поверхности отдельных бактерий сильно уплощенных и выступающих кластеров. Аналогичные изменения поверхности отмечены для кишечной палочки. После 8 часов инкубации с антибиотиками П.С. Брага и Д. Риччи (P.C. Braga и D. Ricci) отмечали полное разрушение бактериальных клеток. В работе также зафиксирована чрезвычайная «липкость» бактериальных образцов, поэтому убедительные изображения удалось получить только для ограниченного числа клеток. Для того чтобы их получить, использовали резонансные режимы сканирования, в которых нивелируется действие латеральных сил, отрывающих бактериальные клетки от подложки. Однако использо-



вание только этого режима не всегда выгодно, поскольку для получения четкой картины внутренней ультраструктуры удобнее использовать сканирование в контакте. В настоящее время в связи с развитием высокоскоростной АСМ-микроскопии логичным продолжением метода стало определение кинетики гибели бактериальных клеток под влиянием известных альтерирующих факторов. В частности, использование высокоскоростной АСМ позволяет определить, на какой минуте начинается изменение морфологии бактерий под действием низкомолекулярных антимикробных пептидов. В этом случае атомно-силовая микроскопия обнаруживает огромные преимущества перед флуоресцентной или конфокальной микроскопией, которые позволяют отследить только конечный этап гибели бактерий, когда клетка становится проницаемой для постмортального красителя.

Уникальные исследования можно проводить, сочетая АСМ с просвечивающей электронной микроскопией. Удалось зафиксировать образование наноразмерных пор вокруг перегородки, образующейся между двумя делящимися клетками, и, таким образом, показать, что клетки обладают собственной протеолитической активностью, способствующей процессу деления. Только что поделившиеся клетки имели на поверхности четко обозначенные концентрические кольца, которые соответствовали вновь формирующемуся пептидогликану. Не менее серьезную трансформацию претерпевает поверхностные ультраструктуры при прорастании спор грибов. В частности, палочковидная регулярность поверхности исчезает, уступая место гелеподобной структуре, состоящей из полисахаридов, которые сразу начинают сильно «залипать» к поверхности зонда (Van Der Aa. B.C. et al., 2001).

Следующий этап развития АСМ применительно к бактериальным клеткам определяется использованием зонда для проведения спектроскопических исследований с целью определения физических свойств клеток и молекулярных сил взаимодействия. Спектроскопия была использована для определения эластичности клеточной стенки бактерий. В частности, было установлено, что тонкая однослойная оболочка *Methanospirillum hungatei* имеет неожиданно высокую жесткость, способную выдержать давление в 400 атм. (Xu W. et al., 1998). Исследование эластических свойств муреиновой сетки в клеточной стенке грамотрицательных бактерий показало соответствие практических результатов с предварительными теоретическими расчетами (Yao X. et al., 1999). Наиболее интересными бывают



сравнительные оценки ригидности бактериальной клетки при разном физиологическом состоянии. Например, *Bacillus anthracis* в вегетативной форме демонстрирует жесткость порядка 12 МПа, а в споровой этот показатель увеличивается сразу до 198 МПа. Воздействие внешних факторов (L-аланин или инозин) существенно снижают ригидность спор (до 24 МПа), а вот воздействие на вегетативные формы антимикробных пептидов, напротив, вызывают повышение жесткости бактериальной клетки. Доказательством того, что увеличение ригидности является неблагоприятным фактором, является то, что бактерии на топографическом изображении разрушены (Pinzon-Arango P. et al., 2010).

Помимо определения эластичных свойств отдельных бактериальных структур спектроскопия позволяет устанавливать тургорное давление всей бактерии в естественной для нее среде (Arnold M. et al., 2000; Yao X. et al., 2002). Тургорное давление грамположительных бактерий определяется величиной от 20 до 50 атм., а грамотрицательных — от 1 до 5 атм. Для *Escherichia coli* в нормальной осмотической среде ригидность клеточной стенки составляет 1,3–1,8 МПа, а тургорное давление — 100–300 кПа. Значительные колебания значений отмечены как для бактерий разных видов, так и для каждой отдельной бактериальной клетки, поэтому А. Туами с сотрудниками (Touhami A. et al., 2003) предупреждают о необходимости создания специальных силовых карт, отражающих изменение показателей силовых кривых над различными участками поверхности бактериальной клетки. Авторы продемонстрировали возможность создания таких карт на примере дрожжевых клеток *S. cerevisiae*. Сочетание топографического изображения со спектроскопией позволило установить, что ригидность почечного рубца в месте отделения дочерней клетки в 10 раз выше, чем остальная поверхность клетки дрожжей (показатели составили соответственно 6,1 МПа для почечного рубца и 0,6 МПа для поверхности материнской клетки). Авторы связали это явление с высокой концентрацией хитина в области рубца.

Дополнительные возможности предоставляет модификация поверхности зонда различными химическими группировками, в частности, покрытие зонда ионизированными карбоксильными группами позволило создать карты локального распределения изоэлектрических точек на поверхности клеток дрожжей (Ahimou F. et al., 2002). Модификация гидроксильными группами, придающими зонду гидрофильную активность, и метиловыми группами, придающими гидро-





фобность, была использована для определения зон гидрофобности у спор *P. chrysosporium* (Dufrêne Y.F., 2000). Однако эти способы не исчерпывают возможности картирования клеточной поверхности. Используя АСМ, можно определять распределения электростатических, ван-дер-ваальсовых сил и сил стерических взаимодействий по поверхности микроорганизма (Dufrêne Y.F., 2001). В частности, несколько изменяя схему АСМ, М.А. Эдвардс с сотрудниками (Edwards M.A. et al., 2010) определили электрический заряд, диэлектрическую константу и удельную проводимость для *Salmonella enterica*. Они предложили использовать этот метод для фенотипирования бактерий, а в качестве преимущества назвали скорость приготовления препарата без сложных дополнительных процедур, например мечения бактериальных клеток.

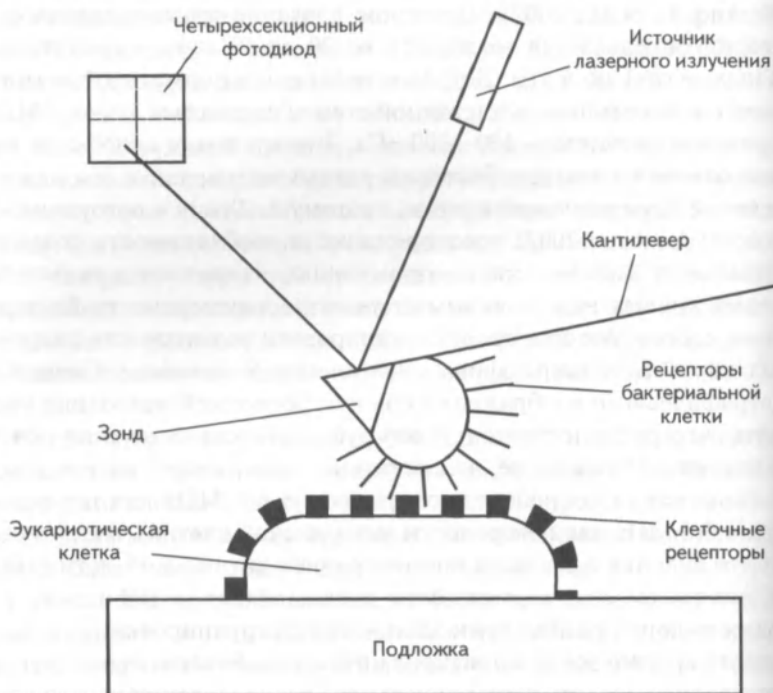


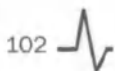
Рис. 4.8. Схема эксперимента по определению сил взаимодействия между двумя клетками, одна из которых иммобилизована на поверхности, вторая — фиксирована на зонде



Раньше достаточно сложно было представить, как с высокой точностью определить силу взаимодействия между двумя клетками: прокариотической и эукариотической. В настоящее время эта процедура перешла в разряд стандартных. На поверхность зонда «сажается» одна бактерия, а на подложке иммобилизуется эукариотическая клетка. В протоколах предпочтение отдается ковалентным методам фиксации прокариот на зонде или кантилере (напомним, что при «связывании» белка лучше использовать линкеры) (рис. 4.8).

Первых успехов в этом направлении удалось добиться ученым из Германии М. Беноит с сотрудниками (Benoit M. et al., 2000), которые сумели посадить на зонд в первую очередь эукариотическую клетку *Dictyostelium discoideum*. Результаты измерения показали, что сила адгезии между двумя клетками составляет 23 пН. Авторы использовали генетические манипуляции, позволяющие контролировать количество адгезивных молекул, экспрессируемых на поверхности клеток, и тем самым определять силу единичных и множественных контактов между клетками.

Сейчас на зонд насаживаются разнообразные клетки: бактерии, подоросли, грибы и т. д. Метод особенно активно используется для исследования механизмов распознавания бактериальных клеток через систему специальных рецепторов PRR (pattern recognition receptors), которые способны узнавать молекулярный образ микроорганизма-возбудителя (PAMP — pathogen-associated molecular patterns). Молекулы PAMP относятся к эволюционно древним и различаются у разных патогенов, в том числе и по аффинности связывания с PRR. Не менее важно определять силу связывания в специфических, например антител-опосредованных, реакциях. Сравнение сил аффинного взаимодействия в специфических и неспецифических реакциях позволяет определить, каким образом распределяются эти процессы в общей схеме иммунного ответа, а также позволяют вычислить несостоятельные звенья, приводящие к развитию инфекционного процесса. Сочетание атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии позволило рассмотреть, что при адгезии бактерий на поверхности эукариотических клеток происходит не только смена экспрессионного профиля и убиквитилирование белков, но и активная перестройка цитоскелета. Атомно-силовая микроскопия позволила смоделировать вариант межклеточного взаимодействия, в том числе регулировать силу прижатия *Yersinia pseudotuberculosis* к эукариоти-



ческой клетке, а флуоресцентная микроскопия зафиксировала реорганизацию актиновой сети на достаточно дальнем расстоянии от места адгезии (Ciczora Y. et al., 2010).

Особые надежды возлагаются на возможности фиксации отдельных структур бактериальных клеток (например, токсинов) на зонд. Такие модифицированные зонды называют «*biotip*»\*. С их помощью можно четко определить локализацию различных клеточных рецепторов, что будет использовано для разработки новых терапевтических методов лечения.

Уже сейчас реализуются многочисленные попытки создания биосенсоров, основанных на сочетании свойств зондов с автоматическими анализаторами. Предполагается, что данный метод диагностики широко войдет в клиническую практику и заменит большинство методов лабораторной диагностики, поскольку позволит быстро и с высокой чувствительностью определять наличие инфекционных агентов и бактериальных токсинов. С помощью модифицированных зондов можно проводить скрининг любых специфических маркеров, т. е. биочипы помимо клинического применения можно использовать в промышленной микробиологии для определения микробных метаболитов. Например, в пищевой промышленности можно оценивать содержание антибиотиков, гормонов и ферментов в мясе и молоке. Можно оценивать ферментативный потенциал бактерий, активно участвующих в процессах биodeградации, например, нефтяных пленок. Большое значение биосенсорика приобретает и при собственно биотехнологических процессах. В частности, при ферментации микроорганизмов, культивируемых в биореакторах, биосенсорика позволяет производить материальный расчет концентрации микробных метаболитов в производственной культуре и определять их видоизменения в процессе культивирования.

Наиболее перспективными направлениями использования атомно-силовой микроскопии в области медицинской микробиологии являются:

- тестирование антибиотиков в режиме реального времени, позволяющее наблюдать за динамическими изменениями клеточной поверхности при применении антибактериальной терапии;

---

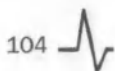
\* Прямой перевод с англ. — биозонд, в данном контексте применяется аналогия с известным понятием биочип (biochip) для того, чтобы еще раз подчеркнуть сходство выполняемых ими функций.

- патогенетические исследования, поскольку метод предоставляет возможность изучения взаимодействия между инфицируемой клеткой и инфекционным агентом в ситуации *in vitro*;
- изучение биопленок, образуемых микроорганизмами на твердых поверхностях. Эти исследования помогут в понимании механизмов контаминации материалов, используемых в хирургии (спицы для вытяжения, аппараты Илизарова и т. д.) для последующей профилактики гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных оппортунистическими бактериями;
- определение наномеханических свойств клеточной стенки бактерий и особенностей их трансформации в процессе клеточного роста;
- выявление стартовых процессов адгезии и инвазии в зависимости от типа инфицирующего агента и инфицируемой клетки-мишени;
- расчет концентрации токсинов и общего числа микроорганизмов в образце, взятом от больного.

## 4.2. АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ И НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Метод атомно-силовой микроскопии позволяет манипулировать с цельными бактериальными клетками, а также извлекать из клеток и изучать единичные молекулы или молекулярные ансамбли. Можно рассматривать механические свойства, структуру и конформационные особенности любых сложных органических молекул: белков, полисахаридов, липидов и их комплексов. Как и при исследовании ДНК, наилучшие результаты достигаются в том случае, если сканирование ведется в жидкости (перестают влиять капиллярные силы) в резонансном режиме (минимизируются латеральные силы).

В первых работах по исследованию белков рассматривалась только их структура на поверхности подложки. В первую очередь исследовались фибриллярные белки (например, фибриллы актина — Braunstein D., 1995). Это связано с хорошей иммобилизацией фибрилл на поверхности и легкостью пробоподготовки. Еще одной причиной обращения к фибриллярным белкам была хорошая осведомленность об их организации, которая позволяла однонаправленно трактовать данные АСМ и выявлять артефакты сканирования. Интересные результаты были получены при рассмотрении молекулы



коллагена (Гущина Ю.Ю., Плохов Р.Г., Зевеке А.В., 2005) (рис. 4.9). Хорошо известно, что основным структурным компонентом коллагеновой фибриллы является тропоколлаген — правозакрученная трехцепочечная спираль, длиной около 300—400 нм и диаметром порядка 1,5 нм. Сканирование в разных средах показало, каким образом гидратация влияет на структуру коллагеновой фибриллы. При сканировании в воздушной среде периодичность составила 67 нм (рис. 4.10), а при переносе коллагенового волокна в жидкость шаг спирали уменьшается до 54—57 нм (рис. 4.11). Кроме того, обнаружилось, что каждый пик спирали удваивается. Таким образом, доказывалось, что изменение гидратной оболочки фибрилл напрямую влияет на геометрические параметры молекулы.

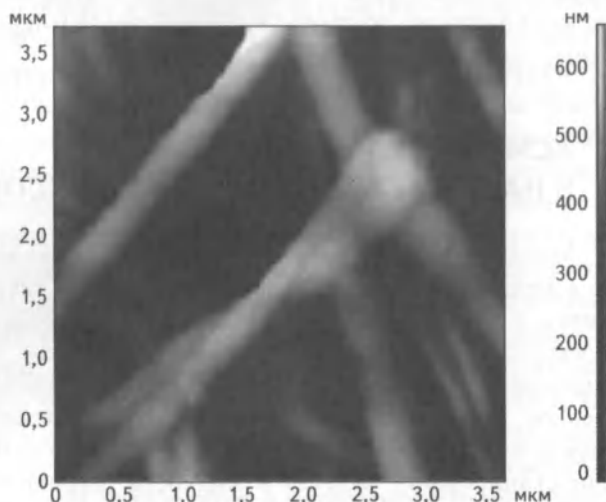


Рис. 4.9. Пучок коллагеновых волокон, АСМ-изображение получено в воздушной среде. Препарат подготовлен Р.А. Плоховым, сканирован Ю.Ю. Гущиной

В жидкости не только можно исследовать влияние гидратации на структуру уже имеющейся молекулы, но и наблюдать за самосборкой фибрилл. Например, в работах, посвященных исследованию самоорганизации амфифильных\* пептидов, рассматривается воз-

\* Амфифильность молекулы — способность обнаруживать одновременно гидрофильные и гидрофобные свойства.

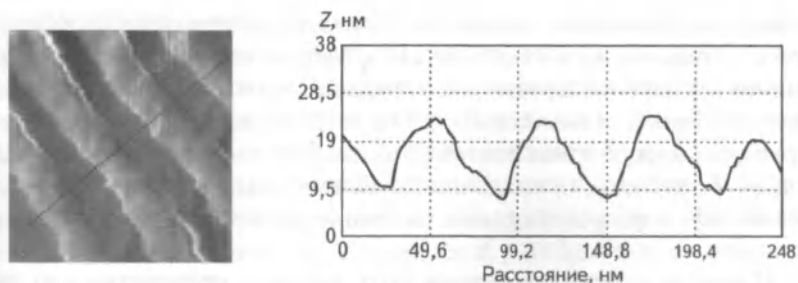


Рис. 4.10. Изображение коллагеновой фибриллы получено в воздушной среде (слева). По профилю поверхности фибриллы можно определить периодичность шага спирали — 67 нм (справа). Препарат подготовлен Р.Г. Плоховым, сканирован Ю.Ю. Гущиной

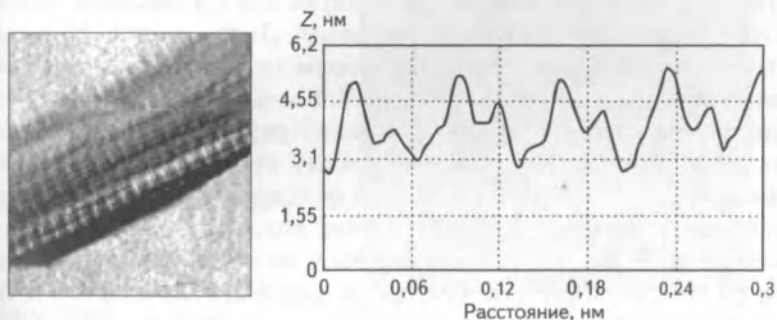


Рис. 4.11. Изображение коллагеновой фибриллы получено в воде (слева). По профилю поверхности фибриллы видно, что периодичность шага основной спирали составляет 57 нм, но каждая основная спираль имеет по два дополнительных пика (справа). Препарат подготовлен Р.Г. Плоховым, сканирован Ю.Ю. Гущиной

возможность формирования стабильных структур в зависимости от концентрации, pH среды, времени и температуры. Как правило, исследования не ограничиваются определением формы этих структур. Определяется влияние на их свойства и стабильность различных внешних факторов (например, ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Alderighi M. et al., 2010). Вайсенхорн с группой сотрудников (Weisenhorn A.L. et al., 1990) наблюдали процесс самосборки актиновых филаментов, исходя из того факта, что плотность поверхностного отрицательного заряда достаточна для запуска процесса конформационных изменений. Сходные исследования проводились и на другом мышечном белке — титине



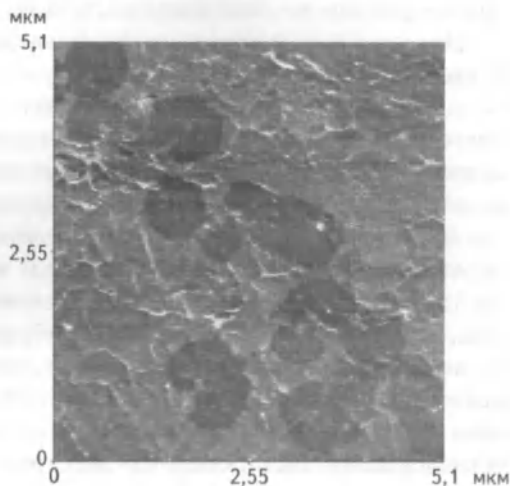
и экстрацеллюлярном матриксном белке тенасцине, участвующем в межклеточных взаимодействиях. Благодаря атомно-силовой микроскопии были исследованы структурные, амортизирующие, упругие свойства белка, а также вычислена энергия перехода в третичную структуру, энергетически выгодную для белка. Кроме того, используя АСМ, помимо динамических наблюдений за поведением белка можно наглядно моделировать ситуацию, возникающую, например, в мышечных клетках.

Изучение структуры амилоидных фибрилл принципиально для понимания патогенеза целого ряда нейродегенеративных и системных заболеваний (болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, системного амилоидоза). Интересной особенностью амилоидных фибрилл является их метастабильность: они достаточно легко диссоциируют на олигомеры, которые формируют поры диаметром порядка 16 нм, вызывающие перфорации клеток. Диссоциацию фибриллы на олигомеры можно вызвать также, применяя силу в процессе спектроскопии. Была обнаружена гетерогенность амилоидных фибрилл, проявляющаяся и в различной длине, и в разной жесткости отдельных субпопуляций белков. В наибольшей степени различались механические свойства (модуль Юнга) фибриллярной и глобулярной (трансмембранной) формы. Оказалось, что механические свойства протофибрилл напрямую коррелируют с их токсическим потенциалом. На модельной системе образования фибрилл и глобулярных трансмембранных доменов можно исследовать активность различных фармацевтических препаратов, применяемых при лечении амилоидозов (Pires R.H. et al., 2010; Relini A. et al., 2010; Rolandi R. et al., 2010).

Не менее важным является исследование липидов, в особенности фосфолипидов, составляющих основу биологических мембран. Понимание пространственной организации липидов является ключевым вопросом в сопряжении структуры и функций мембран. Методом сканирующей зондовой микроскопии удастся выявить «рафты» — функциональные островковые структуры липидного бислоя, определить, что они связаны с элементами цитоскелета (например, «домены смерти» при апоптозе).

Благодаря применению режима Z-модуляции обнаружены абсолютно уникальные фрагменты с высокой «мягкостью» (рис. 4.12). Было выяснено, что это гелеподобные структуры и для них можно рассчитать энергию Гиббса, которая оказалась минимальной для мембранных структур. АСМ-исследования показывали, что эти струк-

туры обнаруживают медленную, растянутую во времени эволюцию: при условии нативности мембраны их форма в жидкости постепенно видоизменяется, и отмечается их медленный дрейф по поверхности мембран (Simonsen A.C. et al., 2010). Биохимическое исследование показало, что форма таких субдоменов напрямую определяется соотношением церамидов и стеролов. Зонд в контактном режиме может влиять на структуру липидов, хотя он и не разрушает медленно дрейфующие структуры (Zou Sh. et al., 2010).



**Рис. 4.12.** Гелеподобные структуры в липидном бислое, обнаруживаемые благодаря использованию режима Z-модуляции

Одним из вариантов липид-протеиновых комплексов с особыми свойствами является легочный сурфактант. Его привлекательность для исследования методом АСМ обусловлена несколькими причинами. Во-первых, это нативная структура, которую достаточно просто подготовить для сканирования, во-вторых, это поверхностная структура, а значит, АСМ является наиболее адекватной методикой для ее изучения, в-третьих, это морфологически неоднородная структура, которая может формировать липид-протеиновые трубочки, планарные бислои, мономолекулярные слои. И наконец, немаловажным фактором является значимость сурфактанта в возникновении целого ряда бронхолегочных заболеваний. Наиболее полные сведения о структуре сурфактанта удастся получить, сравнивая данные исследований в водной и воздушной среде. Конечно, присутствие полярных молекул воды необходимо в том случае, когда нужно определять особенности белок-липидных взаимодействий или



оценивать силы трения, возникающие на поверхности сурфактанта. Именно благодаря исследованиям в жидкости удалось установить, что образование гелеподобных структур (описанных выше) в сурфактанте происходит при давлении 10–40 мН/м. Определение локальных вязко-упругих характеристик легочного сурфактанта дадут ключ к пониманию механизмов возникновения легочных заболеваний (ателектаз, астма, эмфизема и т. д.). А отработка методов контроля липидных переходов предоставит возможность терапевтической коррекции возникающих состояний (Nag K. et al., 2003).

Для упрощения исследований существует возможность создавать искусственные мембранные структуры, обогащать их отдельными липидными компонентами и наблюдать, каким образом видоизменяется при этом их форма и механические свойства. Можно моделировать однослойные и двуслойные мембраны, встраивать в их состав разный спектр интегральных протеинов, воздействовать поверхностными детергентами, исследовать влияние токсинов, температуры, ионной силы растворов, pH и т. д. (Milhiet P.-E. et al., 2010). На такого рода модельных системах удалось продемонстрировать, как механические свойства мембран отражаются на активности мембран-ассоциированных белков, например цитохрома C, пермеаз и т. д. (Morandat S., Kirat K.E., 2010; Picas L. et al., 2010). Перенос мембран на изолирующую подложку и подключение к исследованиям электросиловой микроскопии позволяет определять диэлектрическую постоянную, полное сопротивление, емкостное сопротивление, поверхностный заряд и другие электрохимические характеристики (Fumagalli L. et al., 2010).

Монослои для исследования методом АСМ формируют не только из липидов, но и из белковых молекул. Большинство пленок изготавливают из хорошо исследованных белков: бычьего сывороточного альбумина,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеина и т. д. В белковых монослоях исследуется структурная организация протеинов, при этом фрикционные свойства пленок рассматриваются в режиме действия латеральных сил. Рассматривают также стабильность структуры монослоя, делая на нем царапины зондом и наблюдая время восстановления. Кинетику восстановления можно отслеживать, варьируя условия окружающей среды (Gunning A.P. et al., 1996; Sotres J. et al., 2010).

Основные направления использования АСМ в протеомике:

- изучение морфологии белковых молекул, в том числе их самоорганизацию;

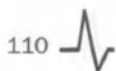


- исследование локальной упругости белков;
- определение сил аффинного взаимодействия между специфическими белками (биотин—стрептавидин, антиген—антитело, рецепторы клеток, участвующих в иммунном ответе, две комплементарные цепочки ДНК и т. д.);
- выявление особенностей структурной укладки глобулярных белков, благодаря применению алгоритма сворачивания—разворачивания (folding—unfolding) белка;
- изучение функциональной активности белка (ферментативной активности, фотоактивации, закрывания—открывания белковых каналов) в режиме реального времени с использованием высокоскоростной АСМ.

Остановимся подробнее на втором и третьем пунктах. Для решения этих задач на подложку сажается исследуемый белок. В том случае, если задачей является определение локальной упругости молекулы, то зонд не видоизменяется. Если нужно определить силу аффинного взаимодействия между двумя белками, то к зонду прикрепляется один из исследуемых белков, к подложке — другой. Затем зонд опускается к поверхности образца. Когда зонд приближается к поверхности, между двумя белками возникает аффинное связывание. При отведении зонда силы белок-белкового взаимодействия вызовут удержание зонда у поверхности и, как следствие, изгиб кантилевера из-за упругости материала, из которого изготовлен кантилевер, является достаточно упругим). Изгиб, пропорциональный силе связывания между белками, легко зафиксировать по возникновению тока рассогласования на фотодиоде. Очевидно, что величина изгиба кантилевера будет прямо пропорциональна силе адгезии между зондом и образцом. Направление исследования сил адгезионного контакта между двумя биологическими молекулами (белок—белок, две цепочки ДНК и т. д.) получило название динамической силовой спектроскопии (в некоторых случаях называют также мода сила — дистанция, цикл приведения — отведения кантилевера или измерение взаимодействия).

Ток рассогласования будет возникать и в том случае, если взаимодействие осуществляется между немодифицированным зондом и инертной твердой подложкой. Характер такого взаимодействия представляют в виде силовой кривой (рис. 4.13).

Взаимодействие между немодифицированным зондом и немодифицированной подложкой описывается кривой *ABCD*, где *B* —



точка контакта зонда с образцом. Она определяется характером образца. Точки *C* и *A* — точки начала и конца силовой кривой. Жесткость взаимодействия между зондом и образцом описывается участком *AB*. Упругое взаимодействие между зондом и образцом, которое описывается участком кривой *ABC*, схематически представлено сверху.



**Рис. 4.13.** Силовая кривая, отображающая взаимодействие зонда и образца. Кривая *CBA* отражает подвод зонда к поверхности, кривая *ABDC* — отвод зонда от поверхности. Характер кривой указывает на жесткое (не биологическое) взаимодействие с наличием высокоадгезионных сил между зондом и образцом (такое взаимодействие возникает, например, между золотым зондом и поверхностью, функционализированной меркаптосиланом)

Внизу схема отражает наличие адгезионных сил между зондом и подложкой, этот процесс описывается кривой *ABDC*, т. е. участок *BD* характеризует наличие адгезии между зондом и образцом. По сути, нормаль, проведенная из точки *D* на прямую *BC*, и характеризует силу отрыва зонда от поверхности. В случае наличия капиллярных сил притяжения зонда кривая выглядит так, как это отражено на рис. 4.13, но если вступают в действие специфические силы адгезии, характер силовой кривой принципиально изменяется. Линейность в значительной степени нарушается из-за того, что белки обычно не связывают с поверхностью зонда и подложки методом физической

адсорбции, а фиксируют их через линкеры. Поэтому при отведении зонда возникают дополнительные пики, связанные с первоначальным растяжением линкеров, и лишь максимальный пик может характеризоваться как точка разрыва адгезионного контакта и учитываться при расчете сил адгезии.

На рис. 4.14 показаны особенности силовой кривой в зависимости от того, специфическое или неспецифическое связывание наблюдается между материалами, фиксированными на зонде и образце.



**Рис. 4.14.** Силовые кривые, отражающие разные механизмы взаимодействия между функционализированным зондом и белком, иммобилизованным на поверхности. Верхняя кривая характеризует отсутствие специфического связывания между белками, закрепленными на зонде и на подложке, нижняя кривая с большим количеством пиков при отводе зонда от образца характеризует наличие большого числа адгезионных контактов, свидетельствующих о присутствии специфического взаимодействия

Например, верхняя кривая отражает взаимодействие между функционализированным (покрытым бычьим сывороточным альбумином) зондом и бычьим сывороточным альбумином, фиксированным на подложке. Очевидно, что характер взаимодействия принципиально отличается от того, что наблюдается при контакте двух жестких структур (зонд—образец). Однако адгезионных пиков в этом случае не отмечается, поскольку при приближении зонда с фиксированным на нем белком к поверхности подложки взаимодействия между абсо-



лотно идентичными белками не происходит, а значит, отклонения (притягивающего) кантилевера также не возникает. Пики отсутствуют, и силовая кривая до точки контакта принимает вид прямой линии. Но при прикосновении к поверхности кантилевер изгибается (как это схематически показано на рис. 4.13,верху); поскольку в отличие от рис. 4.13 в данном случае контактируют две более «мягкие» поверхности (на той и на другой закреплен белок), то и угол наклона к оси  $X$ , отражающий искривление кантилевера, будет намного меньше. Если закрепить на зонде и подложке белки, обладающие высоким аффинным сродством (в приведенном примере это биотин—стрептавидин), то на силовой кривой появляются множественные пики, свидетельствующие о появлении адгезионных контактов. Если отмечается единичный пик, значит, произошло единичное белок-белковое адгезионное взаимодействие, но нередко наблюдается многопиковый характер силовой кривой (как это показано на рис. 4.14, внизу). Многопиковость говорит о множественных белок-белковых взаимодействиях между белками на зонде и на подложке. В этом случае для анализа и расчета силы адгезионного контакта берется последний (ближний к точке  $C$  пик).

При определении силовых взаимодействий важно соблюдать некоторые условия.

1. Иммобилизовать белок на поверхности необходимо с определенной плотностью, чтобы можно было исследовать единичные белок-белковые взаимодействия.

2. Необходимо учитывать высоту белка, иммобилизованного на подложке. Сделать это очень просто: нужно сначала просканировать поверхность ничем не обработанным зондом и по боковому профилю определить высоту фиксированного на поверхности белка.

3. Необходимо избегать перепада температур, чтобы температурные флуктуации не влияли на точность измерения. Постоянная температура должна поддерживаться либо термостатируемой ячейкой, либо элементом Петье.

4. Необходимо откалибровать кантилевер, учитывая изменение резонансной частоты при фиксации на зонде белка (изменение эффективной массы зонда). Резонансная частота для V-образного кантилевера описывается формулой

$$\omega = \frac{1}{2} \pi \sqrt{\frac{k}{m}},$$

где  $\omega$  — резонансная частота кантилевера;  $k$  — константа жесткости;  $m$  — эффективная масса. Когда на кончике зонда фиксируется белок, это приводит к увеличению эффективной массы и, как следует из формулы, к уменьшению резонансной частоты, поэтому отбор кантилевера необходимо производить с учетом изменения резонансной частоты после связывания белка.

5. Далее нужно определить точку  $B$  — точку контакта зонда с поверхностью. Ее определяют дважды: опуская пустой зонд на подложку и опуская пустой зонд на белок, при этом учитываются изменения характера силовой кривой, т. е. по сути калибруется величина изгиба кантилевера, что помогает определить реальную константу жесткости. Можно напрямую записать спектр частот кантилевера после связывания на нем белка и определить резонансную частоту.

6. По силовой кривой взаимодействия пустого зонда с немодифицированной подложкой вычисляют силу адгезии, для этого силу отталкивания  $BD$  проецируют на прямую  $BC$ . Здесь связываются между собой два параметра — расстояние, на которое перемещается зонд, является функцией прикладываемого напряжения. Действительно, при опускании зонда к подложке и при последующем взаимодействии с ней возникает изгиб кантилевера, вызывающий ток рассогласования на фотодиоде, который в свою очередь через систему обратной связи вызовет коррекцию положения кантилевера, благодаря подаче напряжения на пьезокерамику.

7. Необходимо сделать контрольные эксперименты, которые заключаются в измерении силовых взаимодействий между двумя одинаковыми белками (например, бычий сывороточный альбумин на подложке — бычий сывороточный альбумин на зонде) и между белками, один из которых является индифферентным, а другой — специфическим (например, бычий сывороточный альбумин на подложке — биотин на зонде или наоборот).

8. Получив ориентировочные силовые кривые, необходимо рассчитать максимальную скорость подвода зонда к поверхности подложки: как правило, она не должна превышать  $5 \times 10^{-5}$  м/с, а время движения зонда должно быть не меньше 60 мс. Время движения зонда нельзя увеличивать еще и по той причине, что при быстром подведении кантилевера гистерезис пьезокерамики сам по себе вызывает принципиальные различия в кривых подвода и отвода зонда, что может оказать серьезное негативное влияние на точность расчета сил аффинного взаимодействия.



9. Из данных по высоте образца и скорости движения кантилевера нужно определить максимальную силу взаимодействия между зондом и образцом и при превышении этого критического порога кантилевер необходимо отвести от образца.

10. Нужно провести серию измерений, после чего рассчитать силу аффинного взаимодействия между белками, которая определяется максимальной величиной изгиба кантилевера при отрыве белка, фиксированного на зонде от белка, иммобилизованного на поверхности.

Сила взаимодействия  $F$  рассчитывается из соотношения:

$$F = kV_{\text{пьеzo}}t,$$

где  $k$  — константа жесткости кантилевера (реальная константа жесткости, определенная в четвертом пункте);  $V_{\text{пьеzo}}$  — скорость, с которой происходит натяжение пьезоэлемента;  $t$  — время наступления отрыва между двумя белками.

Используя эту методику, группа ученых (Ludwig M., Dettmann W., Gaub H.E., 1997) определила, что сила взаимодействия между двумя специфическими белками биотин — стрептавидин составляет 250 пН, тогда как сила взаимодействия между антигеном и антителом составляет порядка 50 пН. Такие исследования лежат в основе изучения клеточной агрегации и адгезии, например образование дрожжевыми клетками флоккулатов основано на взаимодействии лектиновых структур. Для изучения сил связывания и определения, какие из углеводных остатков ответственны за феномен флокуляции, модифицировали кончик зонда (Touhami A. et al., 2003), посадив на него остаток глюкозы. Использование АСМ-спектроскопии позволило выявить сильное специфическое взаимодействие между молекулой глюкозы и лектинами на поверхности *Saccharomyces carlsbergensis*\*, в то же время прикрепление к зонду маннозы блокировало лектиновые рецепторы и взаимодействия между ними не наблюдалось, что отражала полученная FS-кривая. Таким образом, удалось оказать высокую специфичность в формировании флоккулатов.

Зонд микроскопа может использоваться также, как «наживка» для зацепления и вытаскивания отдельных филаментов из микробного полисахарида (декстрана). При отведении зонда от поверхности кривая «силы—натяжения» четко указывала на растяжение гиб-

\* Используется для производства известных сортов пива.

ких филаментов. Для понимания эластических свойств растягиваемых молекул были привлечены модели классической механики. Выполненные расчеты позволили объяснить, каким образом ведут себя молекулы и каким обратимым (необратимым) изменениям они могут подвергнуться при стрессовых воздействиях внешней силы.

Эти эксперименты позволили моделировать ситуацию связывания лигандов биологическими системами. Эксперименты с растягиванием единичных молекул проводились и на цельных микробных клетках. Например, использование метода на прорастающих спорах *Aspergillus oryzae* позволило выявить на поверхности длинные полисахаридные цепочки, которые принимают активное участие в агрегации спор (van der Aa B.C. et al., 2001). Аналогичные работы проводились по изучению поверхности *Pseudomonas putida* и позволили обнаружить полисахаридные цепи, которые видоизменялись в зависимости от экологического окружения (например, в присутствии солей они широко окружали бактерию). Были выявлены штаммовые и видовые особенности этого признака, что позволило понять различия в адгезивной активности бактерий.

Функции поверхностных белков, такие как адгезия и другие формы межмолекулярных контактов, во многом определяются вторичной и третичной структурами белка, экспрессируемого на мембране и силой связи белка с поверхностью бактериальной клетки. Молекулярная силовая спектроскопия и высокая степень разрешения сканирующего микроскопа комбинируются для изучения структурных особенностей (свертки) белка, его самоорганизации и образования белковых ансамблей. Сначала кривая «сила—натяжение» позволяет обнаружить многочисленные адгезионные пики на поверхности изучаемых клеток, а следующее за этим сканирование поверхности позволяет соотнести локализацию областей, обладающих высокой адгезивной активностью с определенными белковыми структурами на клеточной стенке. Таким образом была обнаружена адгезивная активность белков, образующих поры у *D. radiodurans* и изучены трансмембранные спирали бактериородопсина в мембране *H. salinarum*. Исследование эластических и упругих свойств белков на основе применения СЗМ легли в основу принципиально нового направления исследований — нанохирургии\*. По сути эта новая область пока

---

\* В некоторых изданиях она обозначается как наноиссечение (от англ. *nanodissection*).



направлена исключительно на фундаментальные исследования стабильности клеточных стенок и клеточных мембран, а также определения силы, с которой молекулы «заякориваются» в мембране. Подобные исследования были проведены с мембраной *Corynebacterium glutamicum*.

Особенно активно идет изучение молекулярного распознавания между отдельными белками, поскольку именно эти реакции лежат в основе специфического иммунного распознавания, адгезии, инвазии инфекционных агентов, а также персистенции возбудителя. Важным практическим выходом является использование полученных данных для биоанализа (обнаружения инфекционных агентов в анализируемых образцах), медицинской диагностики (создание биосенсоров с высокой чувствительностью и специфичностью).

Помимо определения сил адгезии и коадгезии важно уметь в комплексе оценить жесткость (ригидность) мембраны. Для определения упругих свойств используется специальный метод FS-спектроскопия (подробно описана в гл. 5). Для режима спектроскопии важны два момента:

- 1) точное позиционирование;
- 2) расчет силы, с которой зонд будет действовать на клетку.

В первом случае принципиальные различия будут обнаружены при опускании зонда не только на разные участки мембраны, отличающиеся по механическим свойствам, но даже на разные структуры внутри «рафта». В частности, взаимодействие зонда с белком может привести к его взаимодействию с зондом и разворачиванию белка, тогда кривая взаимодействия будет иметь один характер. Если же взаимодействия с зондом не произойдет или зонд опустится на липидный фрагмент мембраны, то характер взаимодействия будет абсолютно другим. Важно рассчитать силу воздействия зонда на мембрану правильно, чтобы учесть два условия: взаимодействие с мембраной должно быть достаточным, чтобы получить ее упругий отклик, в то же время воздействие должно быть минимальным, чтобы не повредить клетку, в том числе не проколоть мембрану зондом.



Одними из наиболее интересных объектов атомно-силовой микроскопии является эукариотические клетки и образцы тканей, благодаря исключительной сложности организации, большому числу макромолекул, принимающих участие в процессе метаболизма, тесной взаимосвязи функционирования отдельных компартментов. Не менее интересным направлением является вмешательство в структурную организацию, механическое и другие типы физического воздействия, возможность извлекать отдельные молекулы или даже органеллы эукариотических клеток, т. е. клеточное моделирование и конструирование. В настоящее время не существует другого конкурентного типа микроскопии, который бы как АСМ позволял оценивать одновременно и структурные особенности, и функциональную активность клетки с таким высоким разрешением.

### **5.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

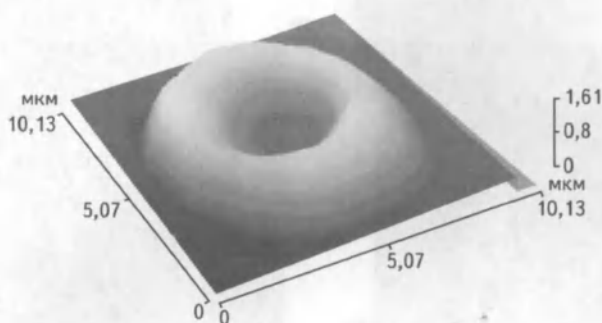
Первоначально клетки макроорганизмов рассматривали исключительно после использования различных фиксирующих агентов, поскольку не были отработаны методы иммобилизации на поверхности, препятствующие смещению образца под влиянием латеральных сил, действующих со стороны зонда. Уже такие исследования показывали огромную перспективность метода АСМ, например возможность визуализации гликокаликса, которую не представляли другие микроскопические методы. А предобработка клеток ферментами, например нейроминидазой, позволяла еще на порядок улучшать качество изображения.



В качестве модельной системы, как правило, выбирались эритроциты. Нетрудно понять логику исследователей: поскольку у эритроцитов имеется собственный анкирин-спектриновый цитоскелет, то клетки легко фиксируются глутаровым альдегидом и могут быть использованы для изучения в контактном режиме сканирования. Уже в этих исследованиях наряду с анализом морфологии (расчет общих размеров, степени овальности, радиуса кривизны центрального углубления) проводится использование дополнительных возможностей, представляемых методом АСМ. В частности, в работе Т.Г. Матюхиной (1999) демонстрируется возможность использования зонда в качестве наноманипулятора, дающего возможность локально «рассекать» клетку, обнажая внутриклеточные структуры. В работе И.А. Кокшарова (Koksharov I.A. et al., 2001) исследуется изменение мембран эритроцитов в процессе окислительного стресса, возникающего при инкубации клеток в присутствии озонированного физиологического раствора (рис. 5.1, 5.2). Б.Н. Зайцев и его сотрудники зафиксировали изменение структуры и физических свойств мембран при взаимодействии с вирусами (2003). В частности, парвовирус вызывал образование специфических упорядоченных кластеров на периферических областях мембраны, а по всей площади мембраны нарушения в виде ямок, тогда как вирус краснухи вызывал агрегацию эритроцитов, которые при этом подвергались значительной трансформации. Атомно-силовая микроскопия позволяет не ограничиваться феноменами *in vitro*, возможно моделирование как отдельных физиологических, так и различных патологических состояний (острые и хронические интоксикации, инфекции, соматические нарушения и т. д.) в системах *in vivo*, с последующим забором крови и исследованием эритроцитарной фракции. Естественно, в этих случаях для формулировки объективных выводов объем выборки необходимо увеличивать. Статистически значимые выборки формируются и в том случае, если исследуются клетки здоровых доноров или людей, страдающих разного рода патологиями.

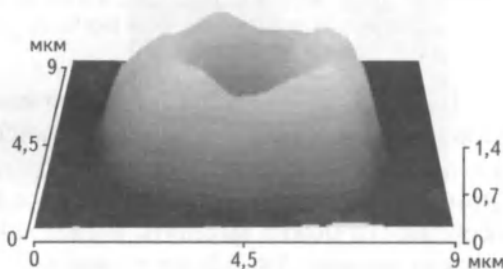
Нужно отметить, что клетки крови быстро стали основным объектом атомно-силовой микроскопии среди других эукариот. Это абсолютно обосновано: во-первых, особенностью крови как ткани является разрозненность форменных элементов, поэтому их легко отмыть и фиксировать. Отдельные клетки являются не только лучшим объектом для пробоподготовки, но и для сканирования, и для интерпретации результата. В данном случае не происходит извлечения

отдельной клетки из целостной ткани, что не отражается на физиологии клеток. Во-вторых, клетки крови обладают высокой экологической пластичностью, т. е. они достаточно быстро изменяют морфологию в ответ практически на любое экзогенное воздействие или в результате эндогенной альтерации. В-третьих, клетки крови имеют достаточно небольшие размеры, что особенно важно при сканировании по оси  $z$  и позволяет наблюдать за ними без повреждения зонда атомно-силового микроскопа и без повреждения поверхности самой клетки.



**Рис. 5.1.** Изображение эритроцита крысы, фиксированного 2%-м глутаровым альдегидом, полученное в контактном режиме методом АСМ. Препарат подготовлен И.А. Кокшаровым, сканирован Ю.Ю. Гущиной

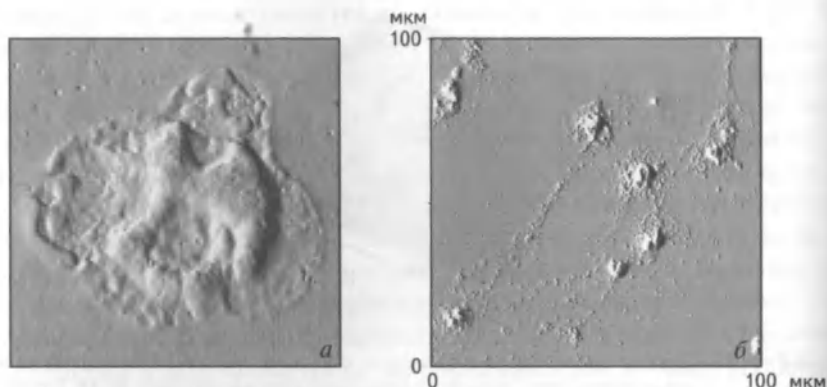
**Рис. 5.2.** Формирование бугристой структуры тора эритроцита крысы при активации клеток озонированным физиологическим раствором (концентрация 44 мкг). Препарат подготовлен И.А. Кокшаровым, сканирован Ю.Ю. Гущиной



Особенно выгодным представляется сочетание высокоразрешающей микроскопии с функциональными тестами. Например, атомно-силовая микроскопия в сочетании с люминол-зависимой хемилюминесценцией позволила подтвердить феномен функциональной дискретности нейтрофилов в процессе фагоцитоза. Было выявлено, что образование нейтрофилами псевдоподий происходит на 5—10 мин



инкубации с микробными агентами (рис. 5.3), тогда как пик респираторного взрыва приходится на 70—90 мин внесения микроорганизмов. А поскольку процессы формирования свободных радикалов кислорода и образование псевдоподий являются катаболическими, зависящими от АТФ, то, скорее всего, в течение респираторного взрыва энергетические ресурсы нейтрофила интенсивно перераспределяются в сторону гексозомонофосфатного шунта для продукции свободных радикалов кислорода, а не в сторону гликолиза для продукции АТФ, которая необходима для активности цитоскелета.



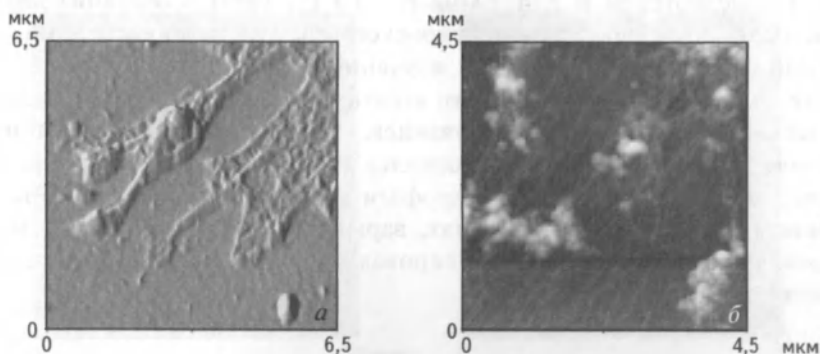
**Рис. 5.3.** Изменение морфологии нейтрофилов при инкубации с бактериями:

*а* — морфология интактной клетки, фиксированной метанолом; *б* — морфология нейтрофила через 5 мин после инкубации со *S. aureus* (клетка фиксирована метанолом)

Во всех случаях, когда активация клетки и проявление ею функциональной активности сопровождается изменением морфологии, а в случае работы с фагоцитами это отмечается всегда, применение атомно-силовой микроскопии является необходимым. Интересные особенности можно выявлять, исследуя процессы фагоцитоза. В частности, на рис. 5.4, 5.5. отчетливо выявляется, что форма псевдоподий нейтрофила отличается в зависимости от поглощаемого объекта. При поглощении клеток *C. albicans* псевдоподии нейтрофилов более короткие и толстые по сравнению с псевдоподиями клеток, фагоцитирующих *S. aureus*.

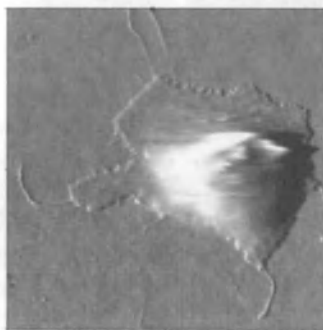
Еще более интересные псевдоподии формируют нейтрофилы при поглощении небиологической субстанции — наночастиц  $\text{Er/Yb}$ , имеющих малые размеры. В данном случае нейтрофилы образуют тон-

кие, абсолютно неветвящиеся, «бичеобразные» выросты, которые отходят как от распластанных участков цитоплазмы, так и напрямую от клетки (рис. 5.5).



**Рис. 5.4.** Образование псевдоподий нейтрофильными гранулоцитами:

*а* — фагоцитирующими *C. albicans*; *б* — фагоцитирующими *S. aureus*. Препараты фиксированы метанолом



**Рис. 5.5.** Образование псевдоподий нейтрофилами, инкубируемыми с Ег/Уб (порошкообразной субстанцией с размером частиц порядка 200 нм). Препарат сканирован Е.Н. Горшковой

Анализ большого количества сканов фагоцитирующих нейтрофилов позволил выявить следующую закономерность: чем меньше поглощаемый объект фагоцитоза, тем тоньше образуемые клеткой псевдоподии.

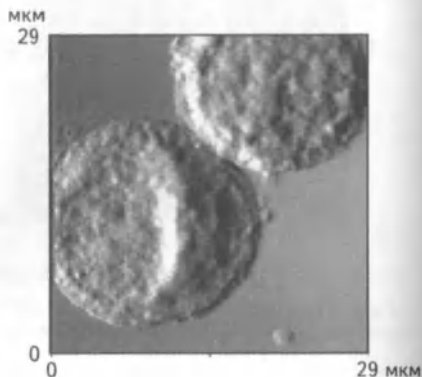
В то же время фагоциты могут поглощать и очень крупные объекты, например можно оценивать фагоцитарную емкость перитонеальных макрофагов по количеству поглощенных ими латексных шариков (рис. 5.6).



Наряду с фагоцитозом разного рода чужеродных частиц метод АСМ позволяет исследовать и экскреторные функции клеток, например экскрецию амилазы, дегрануляцию тучных клеток, выделение медиаторов и т. д. (Xing H., Yu L., 1999). Сочетание двух методов — атомно-силовой микроскопии и хемилюминесценции — было использовано нами для изучения повреждающего агента — пчелиного яда и протективного агента — гепарина. Предварительные эксперименты с использованием гепарина показали, что он не влияет на морфологию перитонеальных макрофагов, что отражает рис. 5.7. Перитонеальные макрофаги мыши инкубировали с гепарином в разных концентрациях, варьировалось и время экспозиции, после чего клетки фиксировали метанолом и исследовали методом АСМ.



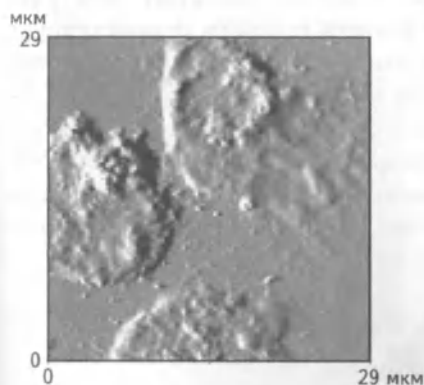
**Рис. 5.6.** Скан демонстрирует поглощение перитонеальным макрофагом крысы 6 латексных шариков. Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гушиной



**Рис. 5.7.** Морфология перитонеальных макрофагов мыши, фиксированных метанолом после инкубации с гепарином. Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гушиной

Тестирование пчелиного яда проводили на перитонеальных макрофагах мыши с теми же временными интервалами. Концентрация пчелиного яда, взятого в эксперимент, варьировалась. Только на мазках, приготовленных после 10 мин инкубации перитонеальных макрофагов мыши с минимальной из испытуемых доз пчелиного яда, отмечалась неизменность клеточной морфологии. В остальных случаях инкубация макрофагов с пчелиным ядом выражалась в резком изменении морфологии клеток: макрофаги имели «рваные» края

и расплывчатые очертания, внутренняя область клетки, где должно располагаться ядро, оказывалась вогнутой (рис. 5.8).



**Рис. 5.8.** Морфология перитонеальных макрофагов мыши, фиксированных метанолом после инкубации с пчелиным ядом (10 мкг/мл) в течение 10 мин. Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гушиной



**Рис. 5.9.** Морфология перитонеальных макрофагов мыши, зафиксированных метанолом после 20 мин инкубации с комплексом «яд—гепарин» (100 мкг/мл—5 МЕ/мл соответственно). Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гушиной

Была продемонстрирована высокая информативность метода СЗМ в оценке повреждающего действия яда на морфологию клеток. В дальнейшем было проведено исследование протекторной активности гепарина в отношении травмирующего действия пчелиного яда. В данном случае схема экспериментов была идентичной предыдущей. Однако перед внесением в суспензию клеток пчелиный яд инкубировали с гепарином в течение 10 мин.

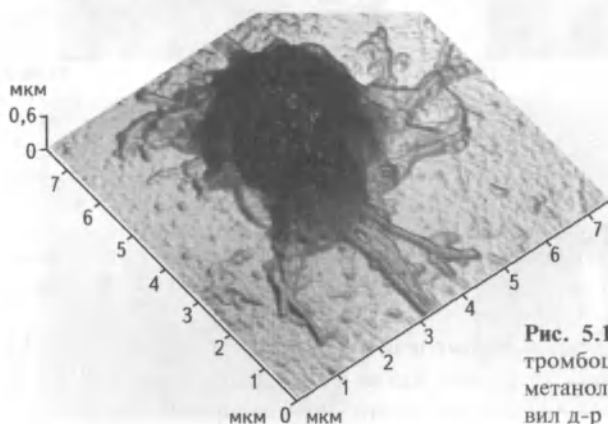
Конечная концентрация компонентов в комплексах «яд—гепарин» составляла соответственно: 1 мкг/мл — 0,05 МЕ/мл, 10 мкг/мл — 0,5 МЕ/мл; 100 мкг/мл — 5 МЕ/мл. Нужно отметить, что в случае определения только морфологических параметров гепарин оказывает гораздо более выраженный протекторный эффект: даже максимальная концентрация яда — 100 мкг/мл при инкубации с 5 МЕ/мл гепарина, по всей видимости, формировала настолько прочное комплексное соединения, что морфологические параметры клеток не изменялись (рис. 5.9). Границы клеток не нарушались и имели четкие очертания, хотя в некоторых случаях, например при увеличении



концентрации яда до максимальной, отмечалось появление атипичных псевдоподий.

Аналогичные результаты по острому токсическому действию пчелиного яда и протекторной активности гепарина демонстрирует функциональный тест — люминолзависимая хемилюминесценция.

В результате этого эксперимента можно отметить, что не только клетки крови, но и зрелые тканевые клетки (например, перитонеальные макрофаги), предшественники которых находились в крови (моноциты), проявляют высокую степень экологической пластичности, что закономерно в связи с выполняемыми этими клетками функциями.



**Рис. 5.10.** АСМ-изображение тромбоцита, фиксированного метанолом, любезно предоставил д-р С.А. Орлов

Вариабельность свойств и морфологических особенностей клеток напрямую зависит от выполняемых ими физиологических функций. Именно эту закономерность позволяет отобразить метод АСМ. В частности, для эритроцитов, основной функцией которых является транспорт газов, наиболее быстрого морфологического отклика можно достигнуть, варьируя содержание активных форм кислорода в окружении клетки. Для нейтрофилов и макрофагов, нацеленных на защиту, адекватным фактором, изменяющим морфологию, является бактериальный, грибковый или даже любой абиотический стимулятор, особенно если он предварительно опсонизирован. Для тромбоцитов (рис. 5.10) основной функцией является регуляция свертывания крови, т. е. также одна из разновидностей защитной реакции. Поэтому морфология тромбоцитов может меняться столь же ради-



кально, как и у фагоцитов. Еще одной общей чертой для этих клеток является то, что даже контакт с подложкой сопровождается их активацией.

На рис. 5.11 представлены разные стадии активации тромбоцита.

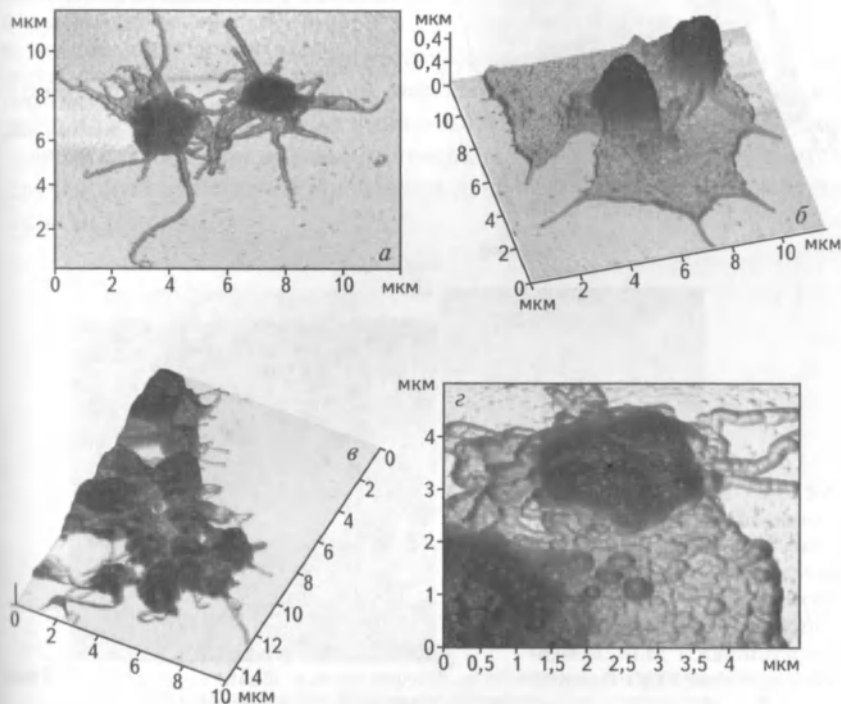
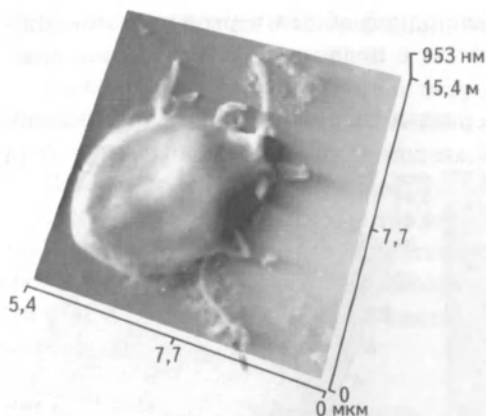
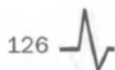


Рис. 5.11. Тромбоциты, фиксированные метанолом, в разной стадии активации:

*а* — активация при контакте с подложкой; *б* — адгезия на подложке; *в* — агрегация тромбоцитов с образованием тромба; *г* — дегрануляция тромбоцита.

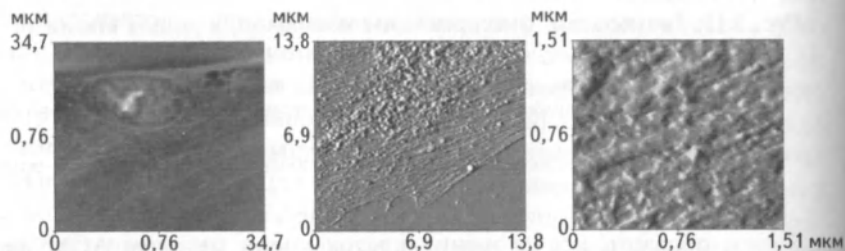
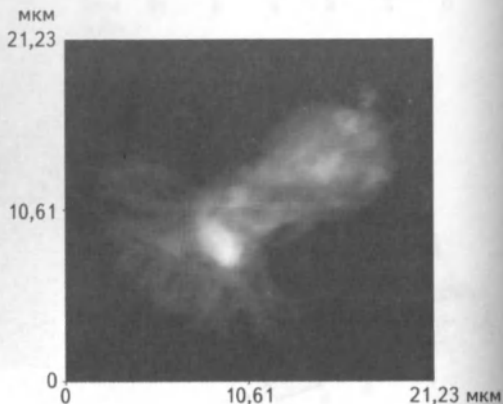
АСМ-изображения тромбоцитов любезно предоставлены д-ром С.А. Орловым

Таким образом, исследования клеток крови методом АСМ не только способствует комплексному рассмотрению морфофункциональных особенностей эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, но и предоставляет богатый материал для выявления общебиологических закономерностей.



**Рис. 5.12.** Единичная клетка однослойного призматического эпителия тонкого кишечника крысы. Основная функция тонкого кишечника — всасывание. АСМ-изображение демонстрирует увеличение всасывающей поверхности эпителиоцита за счет появления сильно ветвящихся микроворсинок. Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гущиной

**Рис. 5.13.** Мерцательные реснички эпителиоцита трахеи крысы. Основная функция — выведение мелких взвешенных в воздухе частиц за счет обратного биения ресничек. Препарат подготовлен М.Б. Звонковой, сканирован Ю.Ю. Гущиной

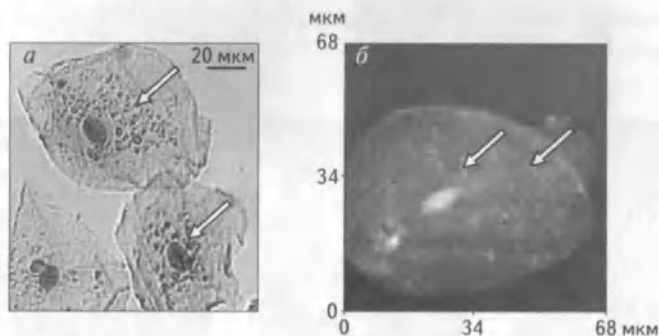


**Рис. 5.14.** Фибробласт кожи человека. Основная функция фибробластов — формирование соединительной ткани в результате процессов деления. Поэтому на АСМ-изображении фибробласта четко визуализируются крупное ядро и развитый цитоскелет

Особенности морфологии клеток в зависимости от типа тканей, к которой они принадлежат, и от физиологических функций этих тканей продемонстрированы на рис. 5.12—5.14.

Однако не во всех случаях АСМ демонстрирует существенные преимущества по сравнению с другими вариантами микроскопии.

Например, при изучении естественной колонизации буккальных эпителиоцитов сканирующий микроскоп, точно повторяющий рельеф поверхности, четко «прописывает» ворсинчатую структуру клеток, таким образом маскируя поверхностную микрофлору. В этом случае преимущество принадлежит традиционной световой микроскопии (рис. 5.15).



**Рис. 5.15.** Естественная колонизация буккальных эпителиоцитов здоровых доноров:

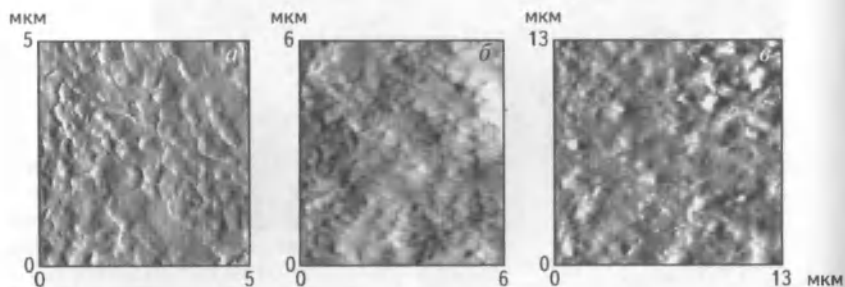
*а* — препарат окрашен азуром А, видеозахват сделан с бинокля Биолам Р. Увеличение  $\times 630$ . Стрелками обозначены микроорганизмы, адгезированные на поверхности буккальных эпителиоцитов\*; *б* — топография апикальной поверхности буккального эпителиоцита, выполненная методом сканирующей зондовой микроскопии. Стрелками обозначены микроорганизмы, адгезированные на поверхности буккальных эпителиоцитов

Но на слизистых оболочках не только сопрягаются факторы специфической и неспецифической защиты организма. В настоящее время активно изучаются механические свойства эпителиальных клеток, которые позволяют выдерживать большую нагрузку, например при растяжении легких (Miyazaki, Hayashi, 2003), процессы эндцитоза, обеспечивающие проникновение патогенных микроорга-

\* Буккальные эпителиоциты — эпителиальные клетки, полученные с внутренней поверхности щеки.



низмов во внутреннюю среду организма, и экзоцитоза, обеспечивающего синтез разного рода биологически активных молекул. В такого рода исследованиях метод АСМ является незаменимым. Упругие свойства слизистых оболочек представляют несомненный интерес, поскольку ими формируется механический барьер, на них разворачивается сложный комплекс физиологических реакций, перестройки и регуляции в ответ на механические, химические и биологические, в том числе микробные, раздражения. Метод АСМ позволяет проводить комплексную оценку топографии клеточной поверхности и создавать «карты эластичности», отражающие чередование ригидных и эластичных участков клеточной поверхности (Henderson, Oberleithner, 2000). Кроме эластичности можно отслеживать и такую важную характеристику, как локальная микротвердость мембран.

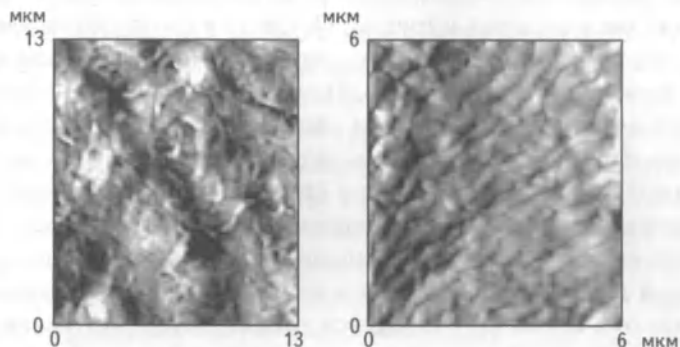


**Рис. 5.16.** Индивидуальные различия в характере ворсинок у разных доноров:

*a* — у донора А. на поверхности буккального эпителиоцита формируются неравномерные гребневидные ворсинки разной формы, участков без ворсинок достаточно мало; *б* — у донора С. ворсинки правильной, близкой к овальной форме, равномерные, достаточно мелкие, безворсинчатые участки мембраны отсутствуют; *в* — у донора Ю. ворсинки неравномерные по форме, размеру и расположению, есть участки мембраны без ворсинок. Мазки фиксированы 1 %-м глутаровым альдегидом

Интересным направлением помимо выявления тканевых и популяционных (или субпопуляционных) признаков является исследование индивидуальных особенностей клеточной структуры у представителей одного и того же вида. Например, морфология буккальных эпителиоцитов у разных людей имеет выраженные особенности. Характер, величина и расположение ворсинок у разных доноров проявляют вариабельность (рис. 5.16).

Имеется существенная разница и в АСМ-изображениях апикальной и базальной поверхностью клеток. Для исследования базальной поверхности использовали метод мазков-отпечатков (прикладывание стекла к внутренней поверхности щеки). В отличие от апикальной поверхности на препаратах выявлялись не ворсинчатые, а складчатые структуры (рис. 5.17).



**Рис. 5.17.** Различная степень складчатости базальной поверхности буккального эпителиоцита у двух разных доноров. Мазки фиксированы 1 %-м глютаровым альдегидом

Базальная поверхность буккальных эпителиоцитов у разных доноров обладает разной степенью складчатости. По всей видимости, складчатость необходима для более полного контакта с нижележащей клеткой.

При работе с фиксированными эукариотическими клетками наблюдается следующая последовательность действий: на нативные клетки воздействуют в системе *in vivo* или *in vitro*, затем клетки фиксируются к подложке и рассматриваются методом АСМ, после чего набирается статистический материал и проводится анализ различий между контрольной группой и опытными образцами. В частности, в работе С. Гримальди (Grimaldi S. et al., 2003) таким образом рассматривалось влияние магнитного поля на клеточную линию В лимфоцитов, инфицированных вирусом Эпштейна—Барр. Клетки подвергали воздействию синусоидальным магнитным полем в течение длительного времени, затем помещали на стекла, покрытые полилизином, фиксировали формальдегидом, отмывали физиологическим раствором и дистиллированной водой, высушивали и рассмат-



ривали в контактном режиме сканирования. Клетки, не подвергавшиеся воздействию магнитного поля, имели куполообразную форму, высокую структурированность и были покрыты микроворсинками, которые хорошо просматривались как на топографическом изображении, так и на боковом профиле клеток. По краям лимфоцитов наблюдались псевдоподии, участвующие в миграции клеток. Клетки, обработанные в течение 9 ч, теряли микроворсинки, псевдоподии также определялись с трудом. После 15 ч не распознавались ни микроворсинки, ни псевдоподии, тогда как куполообразная форма клетки практически не менялась. После 44 ч появлялся эффект «борозд», на поверхности возникали «ямы», а сама клетка теряла сферическую форму. Таким образом, авторы сделали вывод, что после длительной экспозиции мембрана стареет, что визуализируется по увеличению ее грубости и шершавости. С увеличением времени экспозиции высота лимфоцита уменьшается. Авторы связывают это с редукцией цитоскелета, который в норме поддерживает форму клеток. Однако в статье не приводится доказательств, что уменьшение высоты клеток обусловлено именно воздействием магнитного поля, а не возникает в результате высушивания клеток, при их фиксации формальдегидом.

Фиксацию клеток глутаровым альдегидом и осаждение на эпоксидную смолу используют в своей работе С. Лидатаки (Lydataki S. et al., 2003) для исследования ткани роговицы. Такой способ приготовления препаратов, по мнению авторов, позволяет четко визуализировать структуру клетки при предварительном использовании нейраминидазы, гликокаликса и без повреждения наблюдать за клетками в течение 2,5 ч. Исследование нативных препаратов было ограничено временным отрезком в 1,5 ч, поскольку спустя это время авторы отметили резкое набухание ткани роговицы в фосфатно-солевом буфере. Дополнительной трудностью в исследовании нативных препаратов была способность гликозаминогликановых цепей гликокаликса взаимодействовать с кончиком зонда. Поэтому и при исследовании нативных препаратов требовалась предварительная обработка ткани ферментами. В целом нужно отметить, что разрешение клеток при АСМ-микроскопии в воздушной среде выше, чем в присутствии жидкости. Этим наблюдения на клеточном уровне принципиально отличаются от наблюдений за биологическими молекулами — белок, ДНК и т. д.

## 5.2. ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Использование фиксации не позволяет наблюдать за видоизменениями одной и той же клетки в динамике, лишая метод атомно-силовой микроскопии одного из существенных преимуществ. В этом случае, можно только отследить состояние клеток до предпринятого воздействия и после него. Естественно в таком случае для того, чтобы сделать достоверные выводы о происходящих изменениях, необходим большой статистический материал. При исследовании фиксированных клеток теряется еще одно важное преимущество метода АСМ — возможность определять вязкоупругие свойства мембран клеток. Например, в работе Д.В. Лебедева и соавторов (2009) наглядно продемонстрировано, что фиксация эритроцитов глютаровым альдегидом на порядок увеличивает упругость мембран эритроцитов (с 16,2 кПа у нативной клетки до 291 кПа у эритроцитов, фиксированных глютаровым альдегидом).

Таким образом, важным направлением атомно-силовой микроскопии является исследование нативных клеток в режиме реального времени. Однако для достижения этой цели потребовалось решить целый ряд проблем. Первая проблема была тесно связана с иммобилизацией на поверхности подложки. Здесь наилучшие результаты получали клетки, обладающие высоким адгезивным потенциалом (нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, фибробласты), т. е. лучше всего фиксируются клетки ростовых линий (например, клетки злокачественных опухолей, образующие монослой), и клетки, участвующие в иммунном ответе, поскольку для них образование межклеточных контактов является одним из непреложных свойств. Поскольку адгезия зависит от двухвалентных катионов, то для улучшения иммобилизации сканирование лучше всего проводить в буферах, содержащих ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Усилить адгезию к субстрату можно также заменив подложку из стекла на пластик (полистерол, поливинилхлорид). Если перед исследователем стоит одновременно две задачи: изучение фокальных контактов с поверхностью и достижение прочной адгезии, то можно в качестве подложки выбирать полимерные структуры с нанотопографией — наноразмерными островковыми структурами. Большим преимуществом использования такого рода подложек является строгое ориентирование клетки в пространстве.



Выяснилось, что на таких поверхностях меняется не только ориентация клеток, но и их адгезия, морфология, пролиферативная активность, способность к дифференцировке и экспрессионный профиль. Для достижения оптимального результата важно подобрать размеры и плотность нанесения наноразмерных островковых структур на подложке (Dalby et al., 2004).

Одним из вариантов решения проблемы противодействия латеральным силам является использование трековых мембран, как и в случае работы с живыми бактериальными и грибковыми клетками. Но такой вариант фиксации объекта ограничивает все варианты наблюдения за «утопленными» в порах клетками, что неприемлемо, например, в случае изучения процесса фагоцитоза нейтрофильными гранулоцитами или исследования перестройки цитоскелета фибробластов.

Немаловажным фактором является и устанавливаемая скорость сканирования образца. Как правило, медленное сканирование уменьшает «шум», улучшает качество изображения и меньше травмирует клетки, иммобилизованные на подложке. Однако при чрезмерном замедлении сканирования появляется вероятность не только деформации, но и прямого разрушения клеток. К тому же многие биологические процессы, которые позволяет наблюдать метод АСМ в режиме реального времени, являются достаточно быстрыми, поэтому каждый раз в зависимости от цели исследования подбирается оптимальная скорость сканирования. Как правило, при работе в контактном режиме сила воздействия зонда на образец находится в пределах от 1 до 5 пН. Однако сочетание методов атомно-силовой микроскопии и ионокондуктивной микроскопии показало, что даже такое щадящее воздействие на клетки может сопровождаться их повреждением, тогда как переход на резонансные режимы сканирования минимизирует риск повреждения клеток.

Нужно было определиться и с вопросом: насколько сильно зонд может модифицировать поверхность клеток. При работе с органическими веществами, в частности с клеточными культурами, через некоторое время отмечается «загрязнение» зонда органическими молекулами. Важно было определить, не являются ли эти компоненты элементами мембран клеток и как долго клетки могут выживать в процессе исследования методом АСМ, а также сопоставимо ли время выживания клеток с длительностью процессов жизнедеятельности, которые можно наблюдать, используя АСМ-микроско-



пию. Решению этих вопросов была посвящена работа С.С. Счауса и Е.Р. Хендерсона (Schaus S.S., Henderson E.R., 1997). Авторы исследовали культуру глиальных клеток в разных режимах АСМ и показали, что в течение 48 ч после сканирования жизнеспособность клеток не изменялась. Однако использование конфокальной микроскопии, позволяющей оценивать интенсивность свечения флуорофоров, проникающих в клетку через поврежденную мембрану, показало, что в контактном режиме исследования часть фосфолипидов клеточных мембран может накапливаться на кончике зонда. Травматическое воздействие значительно снижается при использовании режима «прерывистого контакта». Аналогичные исследования были проведены нами в отношении нейтрофильных гранулоцитов. Было отмечено, что живые клетки не меняют своей морфологии в течение 2,5 ч наблюдения за ними при использовании резонансного режима сканирования (рис. 5.18).

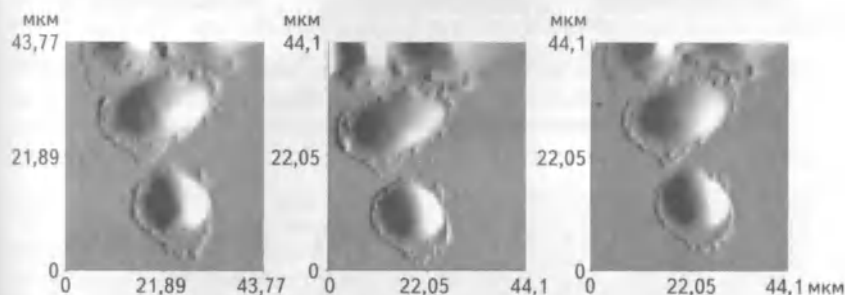


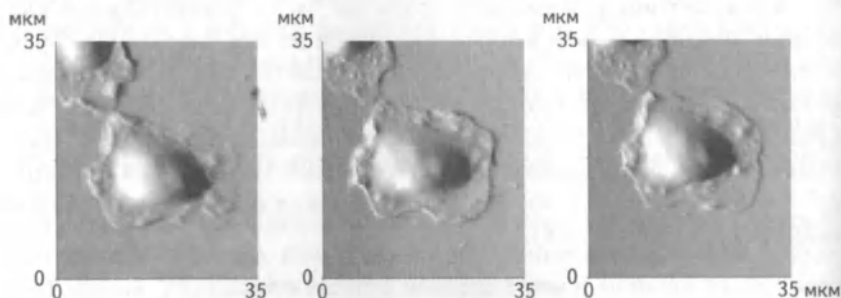
Рис. 5.18. Нейтрофилы в процессе сканирования в резонансном режиме не изменяют морфологию. Сканы снимались каждые 15 мин

Важнейшим вопросом при сканировании нативных клеток является подбор оптимальных буферов для длительных наблюдений. В нашей работе для исследования влияния буферных систем на видоизменения нативных клеток при сканировании использовались разные составы растворов: бедный ионами физиологический раствор, где pH поддерживалась на постоянном уровне — 7,2; раствор Хенкса, где pH варьировала от 7,2 в начале эксперимента до 8,2 — в конце, фосфатно-солевой буфер, где pH поддерживалась 7,4, а также были предприняты попытки наблюдения за нейтрофилами в чрезвычайно неблагоприятных для них условиях: в цитратном буфере (pH = 5,0) и карбонатно-бикарбонатном буфере (pH = 9,5).

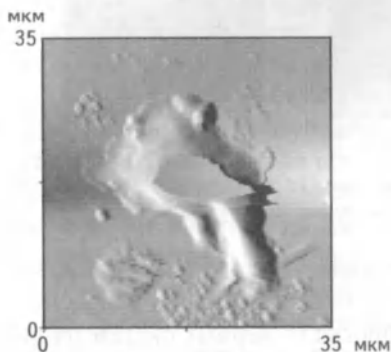


Эти исследования преследовали две цели. Во-первых, определялись границы резистентности клеток к механическому воздействию (сканирование в контактном и резонансном режиме), а во-вторых, определялись оптимальный состав и рН буферов, используемых для долговременных исследований методом АСМ.

Результаты наблюдения за клеткой в физиологическом растворе представлены на рис. 5.19.



**Рис. 5.19.** АСМ-сканы живых клеток в физиологическом растворе (рН = 7,2) в течение 60 мин, сканирование производилось через каждые 20 мин: клетка морфологически пассивна

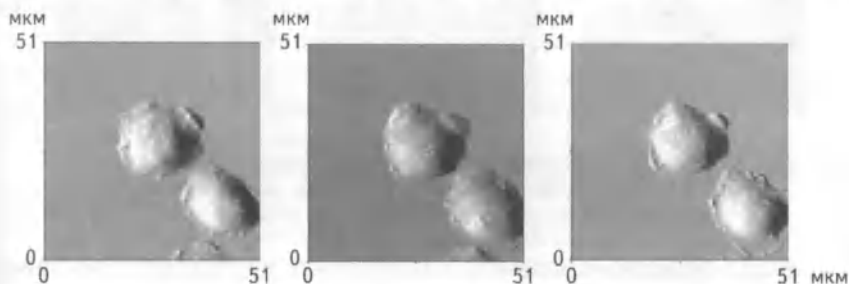


**Рис. 5.20.** Атипичная морфология нейтрофильных гранулоцитов после инкубации в фосфатно-солевом буфере: происходит не только образование псевдоподий в отсутствие стимуляции и увеличение объема клеток, но и регистрируется феномен изменения вязкоупругих свойств мембран: мембрана истончается, становится «мягкой», «податливой», что препятствует процессу сканирования

Принципиально иные результаты получены при сканировании клеток в фосфатно-солевом буфере: отмечалась атипичная морфология клеток, несмотря на то, что никаких дополнительных воздействий не производилось (рис. 5.20). Нейтрофил, инкубируемый в ФСБ, является морфологически нестабильным: клетка плохо распластывается по поверхности подложки, по краям выявлено образование утолщений.

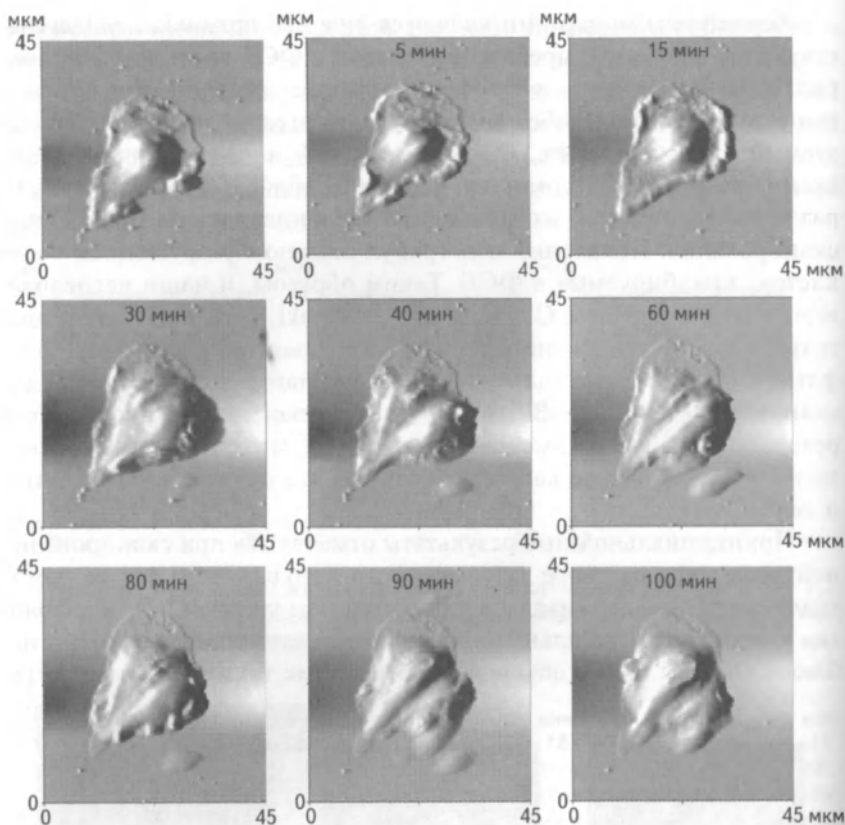
Характерными чертами являются еще два признака, свидетельствующие о том, что пребывание клеток в ФСБ является неблагоприятным. Во-первых, нейтрофил формирует псевдоподии без внесения в среду каких-либо стимулирующих агентов (раствор, используемый в эксперименте, был стерильным) и даже до проведения сканирования. Во-вторых, на подложке обнаруживаются гранулы различного диаметра, их количество увеличивалось на протяжении сканирования. Появление этих гранул связано с разрушением части клеток, инкубируемых в ФСБ. Таким образом, и наши исследования, и эксперименты С. Лидатаки (Lydataki S. et al., 2003) свидетельствуют об одном: несмотря на стабильные значения pH фосфатно-солевой буфер является крайне неблагоприятной средой для сканирования клеток. Возможно, даже ограниченное, особенно в резонансных режимах, механическое воздействие на клетку способно вызвать активацию калиевых каналов, что приводит к набуханию и гибели клеток.

Принципиально иные результаты отмечаются при сканировании нейтрофилов в растворе забуференного Хенкса, в том случае, когда значение pH поддерживалось на постоянном уровне (7,2), морфология клеток была стабильна на протяжении длительного времени наблюдения (рис. 5.21): объем и высота клеток также не изменяются.



**Рис. 5.21.** АСМ-изображения нейтрофилов в забуференном растворе Хенкса: в течение 100 мин наблюдения параметры клеток не изменяются в ответ на сканирование. Сканы снимались через каждые 40 мин

В отсутствие буферных систем значения pH в растворе Хенкса изменяются в течение 30–60 мин с 7,2 до 8,2. В этом случае даже атравматичное сканирование клеток в неконтактном режиме может привести к значительному увеличению их объема. Результаты представлены на рис. 5.22.



**Рис. 5.22.** АСМ-изображения нейтрофильных гранулоцитов в растворе Хенкса с изменением рН от 7,2 до 8,2: при сканировании клеток дольше 30 мин их объем значительно увеличивается

Таким образом, изменения рН, равно как ионный состав среды, оказывают значительное влияние на механические свойства клеток. В бедной ионами среде с постоянным значением рН (физиологический раствор) клетки не чувствительны ни к контактному, ни к резонансному режиму сканирования. Изменения рН среды при обогащении ионного состава делают нейтрофил максимально чувствительным к любому, даже слабому механическому воздействию. Исследование клеток в буферах, неблагоприятных для нейтрофилов с высокой кислотностью (цитратный буфер рН = 5,0) или сильно защелоченными (карбонатно-бикарбонатный буфер рН = 9,6), пока-

зало, что в таких условиях клетка утрачивает способность к адгезии, поэтому проведение СЗМ в таких условиях невозможно.

Таким образом, для поддержания клеток в физиологически активном состоянии в течение длительного времени для исследования их методом АСМ необходимо правильно подбирать буферную систему. Применение сред с белковыми компонентами нецелесообразно, поскольку не адекватны методологии исследования, затрудняя сканирование. Поэтому для проведения АСМ-исследований необходимо использовать достаточно «бедные» солевые растворы, которые позволяют проводить наблюдения за изменениями морфологических параметров клетки в течение длительного времени (до 4–5 ч). Наиболее подходящими для этих целей являются забуференный физиологический раствор и забуференный раствор Хенкса. Для наблюдения за клетками в витальном состоянии принципиальным является как солевой состав буфера, так и pH среды, в которой проводится исследование. В случае неоптимального состава буфера, например ФСБ, или нарушения pH среды при использовании не забуференного раствора Хенкса наблюдается однотипная реакция клетки: значительное набухание. Поскольку набухание, как правило, свидетельствует о начале некротической гибели клеток, то вышеперечисленные факторы нужно исключить в случае длительного АСМ-исследования клеток.

После подбора оптимальной подложки, метода иммобилизации, состава буфера и режима сканирования можно проводить самые разнообразные АСМ-исследования эукариотических клеток. Основными направлениями являются:

- изучение собственных динамических (физиологических) процессов клеток;
- видоизменения структуры и функций клеток в ответ на внешние воздействия различной природы (механический стресс, биохимические стимулы и т. д.).

В работе Г.Р. Бушеля (Bushell G.R. et al., 2003) показано, что АСМ позволяет отслеживать и медленную и быструю динамику изменений в клеточной культуре, находящейся в физиологических жидкостях. В качестве медленных процессов приводятся такие реакции, как динамика формирования цитоскелета при распластывании клеток по поверхности подложки или рост кристаллов диформаза, возникающих в результате восстановления нитросинего тетразолия в процессе энзиматической конверсии, протекающей в фиброблас-



тах, нейтрофилах, моноцитах и тромбоцитах\*. Авторы данной работы отслеживали процесс в течение трех часов.

Особенно хорошо внутренние структуры клеток визуализируются при применении сканирования с приложением постоянной силы. Здесь кончик зонда проводит своеобразное «пальпаторное» исследование поверхности клеток, и глубина такой пальпации может быть различной. По мнению А.С. Боровика и его сотрудников (2000), это объясняется тем, что при сканировании острие зонда прогибает мягкую клеточную мембрану и поэтому на поверхности проступают контуры более жестких участков цитоскелета и клеточных органелл. Но не только выступающие и жесткие элементы клеток могут быть прописаны в режиме воздействия постоянной силы, хорошо визуализируются и такие элементы, как углубления и фенестрации, например у эндотелиальных клеток печени. В работе Ф. Браета (Braet F. et al., 2001) показано, что элементы цитоскелета более резистентны к действию зонда, и резистентность одинакова для всех основных элементов цитоскелета: микрофиламентов, промежуточных филаментов и микротрубочек. Аналогичного мнения придерживаются и Т. Бердыева с соавторами (Berdyueva T. et al., 2005), которые предлагают и другой способ улучшения изображения элементов цитоскелета — обработку поверхностным детергентом (твином) в низкой концентрации. Твин, разрушая мембрану, обнажает цитоскелет кожного эпителия крайней плоти. Авторы отмечают, что в данном случае латеральное разрешение метода составляет 20 нм. Помимо уже отмеченных преимуществ метода АСМ они приводят такие аргументы в его пользу, как возможность количественного сравнения элементов цитоскелета у разных клеток, возможность прямой детекции, которая не зависит от красителей или меченых молекул, возможность длительного хранения препарата. Однако, несмотря на множественные аргументы авторов, данную методику нельзя охарактеризовать как атравматичную. Хотя благодаря обработке детергентами и удастся достичь более высокого пространственного разрешения, но такое преимущество АСМ, как возможность динамических наблюдений, полностью утрачивает-

---

\* Данный тест используется для оценки степени активации кислородзависимых механизмов фагоцитоза. Результаты стимулированного теста дают представление о способности клеток к активации *in vitro* под действием разных агентов.

ся. Для определения роли цитоскелета в реализации различных динамических процессов клетки проводят сканирование эукариот в нативном состоянии, после чего воздействуют на клетку веществами, блокирующими элементы цитоскелета (цитохалазин В, латринкулин А), а затем отмечают изменения в морфологии и эластичности различных клеточных элементов (Rotsch et al., 1997).

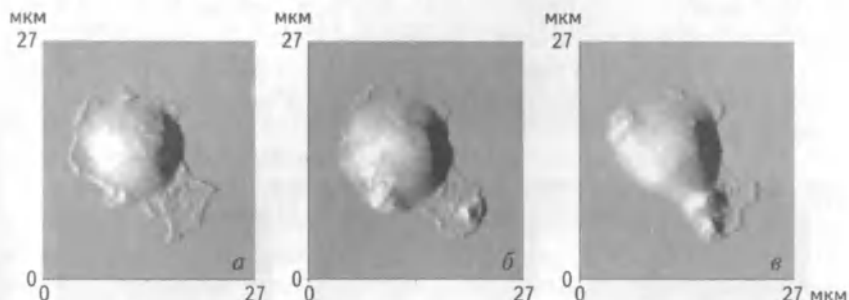


Рис. 5.23. Изменение морфологии нейтрофилов при апоптозе:

а — через 70 мин после инкубации с липополисахаридом (ЛПС); б — через 80 мин после инкубации с ЛПС; в — через 90 мин после инкубации с ЛПС

Интересным направлением является исследование медленных динамических процессов, длительно разворачивающихся во времени. Здесь использование атомно-силовой микроскопии является незаменимым. В частности, используя наблюдения в режиме реального времени, можно качественно оценивать различные варианты клеточной гибели. Например, оценка соотношения проапоптотических\* и антиапоптотических факторов сейчас является одной из центральных задач биологии. На рис. 5.23 представлено изменение клеточной морфологии, характерное для апоптоза, которое возникло в результате сочетанного воздействия биохимического (липолисахарида) и механического (зонда) факторов. Наблюдения за еди-

\* *Апоптоз* — процесс самопроизвольной клеточной гибели (суицида). Может запускаться через разные механизмы. В отличие от некроза апоптотическая гибель клеток не сопровождается выделением физиологически активных веществ во внеклеточное пространство: генетический материал клетки аккуратно отпочковывается в составе апоптотических телец и быстро поглощается макрофагами. Процесс можно регулировать: запускать проапоптотическими факторами либо тормозить антиапоптотическими. В последние годы наблюдается активный интерес к процессу апоптоза, как механизму, противоположному митозу клеток при злокачественных новообразованиях.



ничными нейтрофилами в течение длительного времени показали, что вначале клетка набухает, затем объем уменьшается. Впоследствии периодические изменения объема сопровождаются фрагментацией и отделением ядерного материала от клетки.

Гораздо быстрее клетка гибнет по механизму некроза: первоначальное набухание сопровождается снижением эластичности клеточных мембран, что практически сразу приводит к удалению клетки с поверхности подложки в результате действия латеральных сил со стороны зонда. На рис. 5.24 представлены результаты по исследованию некротической гибели нейтрофилов под действием пероксида водорода.

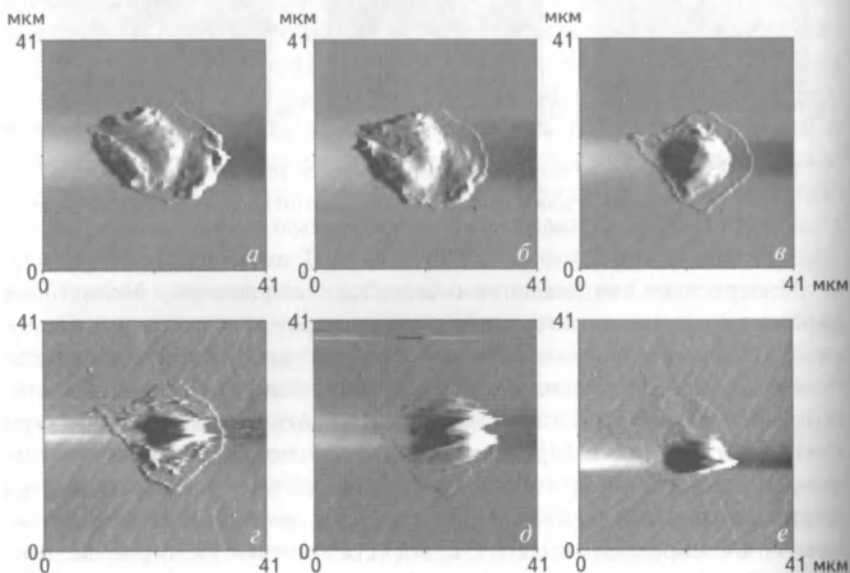


Рис. 5.24. Некротическая гибель нейтрофильных гранулоцитов под влиянием  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации 3 мМ, изображения получены в физиологическом растворе в режиме реального времени методом АСМ: *a, б* — интактная клетка; *в* — нейтрофил через 10 мин после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; *г* — нейтрофил через 25 мин после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; *д* — нейтрофил через 45 мин после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; *е* — нейтрофил через 55 мин после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Однако гибель клеток — это крайнее проявление действия неблагоприятных факторов на живые клетки. Можно моделировать стрессорное воздействие таким образом, чтобы оно было лимитиро-



вано: например, проводить сканирование фибробластов в контактном режиме, воздействуя постоянной силой, которая бы не разрушала клетку. Кроме того, зондом можно вызывать локальные деформации образца, а затем визуализировать клетки в резонансном режиме сканирования. Таким образом можно наблюдать появление стрессовых фибрилл фибробластов (Braet F. et al., 1997). Можно измерять скорость формирования этих фибрилл и проводить сравнения при разных стрессовых воздействиях. Отработанные модельные системы наблюдений в оптимальной для клеток жидкой среде позволяют исследовать не только поглощение латексных шариков, но и апоптозных телец макрофагами, т. е. напрямую изучать кинетику жизненно важных процессов.

Начинают накапливаться сведения о том, что структура поверхности и внешняя морфология злокачественно трансформированных клеток могут отличаться от топографических характеристик клеток нормальной ткани, правда пока не приводится существенных доказательств преимуществ АСМ перед оптической микроскопией или флуоресцентной с использованием иммунных меток (Tomankova K. et al., 2007). Совсем иначе можно оценить применение атомно-силовой микроскопии при исследовании оптически прозрачных клеток, например, при сравнении клеток здорового зрачка и клеток зрачка, пораженного катарактой. Только использование режима микротвердости атомно-силового микроскопа позволяет выявить изменения волокнистых клеток зрачка при катаракте: на начальных этапах созревания катаракты исчезают характерные для волокнистых клеток зрачка языковидные и желобовидные структуры, а при созревании катаракты исчезает и сама характерная фибриллярная структура клеток зрачка (Antunes A. et al., 2007).

Исследование быстрых динамических процессов, например изменение микромеханических свойств кардиомиоцитов при пульсации, лимитируется скоростью прохождения зонда по поверхности клетки. Существует два варианта решения этой проблемы: можно использовать высокоскоростную АСМ-микроскопию. Но она пока применяется только для исследования быстрых динамических процессов на уровне белков и мембран (нет перепада высот). Зато именно высокоскоростная микроскопия дает возможность мониторинга изменения мембран в ходе реализации энзиматической активности, связывания с лигандами и моноклональными антителами структурных мембранных белков, активации и блокирования ионоселектив-



ных каналов. Вторым интересным выходом является использование режима слежения за отклонением зонда по оси  $z$  при сохранении постоянных параметров  $x$ — $y$ . В этом случае зонд просто опускается на поверхность клетки, а с помощью четырехсекционного фотодиода удается отслеживать его отклонения в вертикальной плоскости и, таким образом, оценить колебания клеточной поверхности.

Однако вполне обоснованные затруднения, связанные с исследованием мышечных тканей, легко преодолеваются при изучении соединительных тканей. В частности, хорошего разрешения удается достичь, используя в качестве объекта исследования хондроциты и остеобласты. Ж. Бишов и его соавторы (Bischoff G. et al., 2003) отмечают, что наблюдения за хондроцитами можно вести в течение 8 ч, при этом лучше всего использовать режим латеральной силы. Картина распределения латеральных сил в течение 2 ч не изменялась, отсюда авторами делается косвенный вывод о том, что зонд не повреждает поверхность клеток. В работе отмечается, что этого промежутка времени вполне достаточно для изучения воздействия различных медиаторов на клеточную поверхность (цитокинов, митогенов, ферментов), однако в данной статье Ж. Бишов и его соавторы (Bischoff G. et al.) не приводят примеров подобных исследований. Ими отмечается также, что очень трудно вести наблюдения за клетками остеосаркомы; в данном случае они советуют рассматривать не морфологию, а наблюдать за изменением вязкоупругих свойств мембран клеток злокачественных новообразований. Для того чтобы отслеживать быстрые динамические процессы, предлагается проводить быстрое сканирование клеток, а при долговременном наблюдении за клетками необходимым условием является слежение за тем, чтобы буфер не кристаллизовался\*.

Сочетание двух методов сканирующей зондовой микроскопии и конфокальной микроскопии используется также для определения перестроек структуры цитоскелета остеобластов в ответ на механические нагрузки. В работе Ж.Т. Чарраса и М.А. Хортон (Charras G.T., Horton M.A., 2002) наглядно показано, что зонд можно использовать в качестве манипулятора, моделирующего механическое сжатие или напряжение на клетке, при этом отмечается, что задаваемую силу деформации можно строго регулировать, производя очень

---

\* Наши наблюдения показывают, что это затруднение полностью снимается при использовании жидкостной ячейки.

точное воздействие малыми силами, не повреждающими клетку. Авторами отмечается, что остеобласты реагируют не только на надавливание, но и на последующее отведение зонда от поверхности клетки, вторая реакция оказывается даже более выраженной, в 22 % клеток релаксация вызывает увеличение уровня внутриклеточного кальция. Благодаря сочетанию двух методов удастся впервые установить, что увеличение уровня внутриклеточного кальция происходит не только в клетке, на которую производилось воздействие, но и в соседних клетках. Авторы подробно описывают механизмы активации механо-чувствительных каналов, перестройку элементов цитоскелета (актина, тубулина и промежуточных филаментов), которую удалось проанализировать благодаря использованию различных ингибиторов в отработанной модельной системе (цитохалазина В, диамида, акриламида и др.).

Многие авторы используют в своих работах метод АСМ как универсальный метод моделирования сил напряжения или сжатия, особенно важными представляются эти исследования для тканей, подвергающихся в организме постоянному изменению сил натяжения (эндотелий кровеносных сосудов, эпителий стенок мочевого пузыря и т. д.). Следует отметить, что в этих работах исследователи отходят от традиционных методов работы с отдельными клетками, предпочитая использовать тканевые структуры, без чего не возможно исследование взаимодействий. В работе Х. Мияцаки и К. Хайяши (Myiazaki H., Hayashi K., 2003) измерялись механические свойства интактных эндотелиальных клеток артерий, для чего препарированные артерии помещали на силиконовую растягивающуюся подложку и исследовали *in situ* в растворе Хенкса. Такое исследование представляется авторам наиболее достоверным, поскольку хорошо известен факт, что морфология, внутренняя структура и механические свойства эндотелиоцитов сильно зависят друг от друга и оказывают комплексное влияние на гемодинамику. В исследованиях механических свойств сосудов Х. Мияцаки и К. Хайяши (Myiazaki H., Hayashi K.) наибольшее внимание советуют уделять двум моментам: времени наблюдения — оно не должно превышать 12 ч и чистоте зонда — на него не должны сорбироваться органические молекулы, иначе это приведет к увеличению его диаметра и искажению результатов исследования.

На современном этапе исследователи не ограничиваются определением механических характеристик мембран, поскольку с по-



мощью АСМ можно моделировать передачу сигнала от клетки к клетке. Такой эксперимент был проведен М.Ж. Лангером с сотрудниками (Langer M.G. et al., 2001), смоделировавшие передачу сигнала в стереоцилиях пучков клеточных волосков внутреннего уха. Эксперимент был проведен следующим образом: на один из волосков пучка воздействовали зондом, вызывая латеральное давление, после чего снимали сигнал с соседнего волоска. Проведенные исследования показали слабую силу взаимодействия между высокими стереоцилиями. Было установлено, что скелет стереоцилий — параллельно ориентированные актиновые филаменты — играет важную роль в перекрестных связях и эластических свойствах волосков, а сами стереоцилии могут связываться как сторонами, так и концами.

### 5.3. FS-СПЕКТРОСКОПИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИГИДНОСТИ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Развитие техники сканирования живых клеток позволило значительно продвинуться в разных областях исследования их структуры, вязкоупругих свойств и функций. Для оценки ригидности мембран используют режим FS-спектроскопии. Ригидность мембран оценивается по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца (Hassan et al., 1998; Henderson, Oberleithner, 2000). Поэтапный расчет модуля Юнга проводится исходя из значений силовых кривых, полученных экспериментальным путем. Изменения в течение времени механических свойств живых клеток отражает целый комплекс физиологических процессов. Они особенно важны для измерения клеточной механики и ее регуляции. В настоящее время многие вопросы, касающиеся вязкоэластических свойств клеток остаются открытыми:

- каким образом отражается на морфологии и физиологии клеток внешний механический стресс;
- какова роль микромеханики в процессах клеточного деления, дифференцировки, пролиферации;
- экспрессию каких генов запускают изменения механических свойств;
- как ригидность мембран отражается на скорости секреции и процессах межклеточных взаимодействий.

Ответы на эти и многие другие вопросы может дать атомно-силовая микроскопия. В данном случае кончик зонда используется как инструмент для локального определения вязкоэластических свойств мембраны (рис. 5.25). Измеряя эти локальные свойства в различных точках образца, можно обработать полученные данные и получить карту эластичности исследуемого образца.

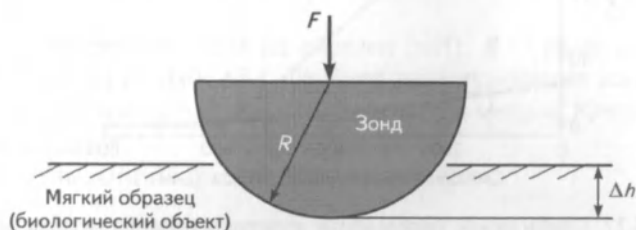


Рис. 5.25. Схема погружения зонда в мягкий образец (мембрану клетки-мишени)



Рис. 5.26. Спектроскопические измерения в буферном растворе (FS-кривые)

Суть метода заключается в разном отклонении кантилевера при контакте с твердым и мягким образцом (рис. 5.26). При этом кривую отклонения кантилевера в зависимости от перемещения пьезосканера  $D(z)$  необходимо преобразовывать в кривую зависимости величины прогиба поверхности под иглой, от силы, приложенной к зонду  $F$  (рис. 5.27).



Рис. 5.27. Графическое определение величины прогиба мембраны под воздействием зонда

Эта операция осуществляется в несколько этапов.

1. По калибровочной кривой (опора на стекло) пересчитывается отклонение кантилевера из наноамперов в нанометры и вычисляется заданная сила, при этом упругость кантилевера — величина, известная из его технических характеристик:

$$\alpha = \frac{D_c}{z},$$

где  $\alpha$  — тангенс угла наклона линейного участка в области упругой деформации (нА/нм);  $D_c$  — ток рассогласования фотодиода при опоре на стекло (нА);  $z$  — расстояние, на которое перемещается зонд при подводе к жесткой поверхности (нм);

$$F = \frac{-k_z}{\alpha} D_o,$$

где  $F$  — приложенная к зонду сила (нН);  $k_z$  — жесткость зонда (нН/гм);  $D_o$  — ток рассогласования фотодиода при опоре на образец (нА).

2. Различие  $\Delta h$  между силовыми кривыми, полученными на исследуемом мягком и твердом калибровочном объектах, дает величину прогиба поверхности мягкого образца под зондом.

3. В результате получают кривую, отображающую взаимосвязь приложенной силы и величины прогиба поверхности под зондом, по которой можно вычислить модуль Юнга (Bukharaev et al., 2003).

Для этого используется модель Герца, в которой рассматривается взаимоотношение жесткой полусферы (зонда) и бесконечной плоскости (биологического образца, площадь которого по сравнению с зондом является бесконечно большой):

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E^* \Delta h^{3/2},$$

где  $F$  — сила, действующая на образец (нН);  $R$  — радиус закругления кончика зонда (нм);  $\Delta h$  — глубина проникновения зонда в биологический образец (нм);  $E^*$  — эффективный модуль Юнга системы игла—образец.

4. Модуль Юнга определяется по формуле

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \mu_z^2}{E_z} + \frac{1 - \mu_{обр}^2}{E_{обр}},$$

где  $E_z$  и  $E_{обр}$  — модуль Юнга зонда и образца соответственно; в данном случае

$$E_z \gg E_{обр};$$

$\mu$  — коэффициент Пуассона, в данном случае он находится в зоне  $0 \leq \mu E_{обр} \leq 0,5$ , и погрешность, вносимая им пренебрежимо мала.

Таким образом, формула для расчета модуля Юнга образца упрощается до формы:

$$E_{обр} = E^* (1 - \mu_{обр}^2).$$

В спектроскопических измерениях важно правильно установить силу воздействия зонда на поверхность клетки. Она не должна превышать 100 пН. Не менее важным условием является скорость отработки сигнала в петле обратной связи (Tamao et al., 2001). Принципиальными для правильного результата являются еще два фактора: геометрия зонда и скорость его подвода к поверхности клетки.

Легче всего определять жесткость прочных тканей (костной, хрящевой, дентина зубов, волос и т. д.), поскольку в данном случае измерения мало отличаются от определения упругости жестких физических поверхностей (Kalinin S.V. et al., 2007). Интерес к механическим свойствам костной ткани обусловлен также и тем, что кость является природным нанокомпозитным материалом, а трабекулы



кости высоко структурированы. Эти свойства являются перспективными и в тканевой инженерии, и в трансплантологии, и в пластической хирургии, и в зарождающейся нанотехнологии. Понимание механической организации трабекул помогает им в профилактике такого социально значимого заболевания, как остеопороз. Атомно-силовая микроскопия позволяет количественно и качественно определить локальную геометрию трабекул, такую как расположение и форма кристаллов гидроксиапатита, диаметр коллагеновых волокон, ультраструктуру коллагена. Эти сведения помогают определить, какие факторы лежат в основе заболеваний костей (остеопороза и остеомалации), насколько велики границы костной эластичности и т. д. Не менее интересными являются наблюдения за динамической активностью остеокластов (Turner P. J. et al., 2007).

Механические свойства мягких клеток определяются в первую очередь элементами цитоскелета и физическим взаимодействием с окружающей средой. Они могут существенно меняться в процессе клеточного деления или гибели клеток, движения везикул, поглощения внеклеточных материалов, передачи сигналов и других типов взаимодействия клеток, в результате клеточного движения и т. д. Даже клетки, принадлежащие одной и той же ткани, могут существенно менять упругие свойства в зависимости от возраста. В частности, упругость более старых клеток эпителиальной ткани в 2–4 раза превышает ригидность молодых, только что образованных клеток. Ригидность мембран может обратимо меняться. В частности, рассматривая влияние гамма-облучения на упругие свойства эритроцитов, А.А. Бухараев и соавторы (Bukharaev A.A. et al., 2003) показали, что облучение кроликов гамма-лучами вызывает снижение упругости мембран их эритроцитов в два раза по сравнению с контрольной группой. Однако этот эффект отмечен только на первые сутки после облучения, эритроциты способны постепенно восстанавливать упругие свойства, и эта тенденция отчетливо проявляется уже на четвертые сутки после облучения. Интересную взаимосвязь между морфологией и механическими свойствами клеток отметила группа профессора М.Дж. Возняка (Wozniak M.J., 2010). Хондроциты, изолированные из коленного сустава, после нескольких пассажей быстро меняли свою морфологию (с типичной округлой формы на фибробластоподобную). Эти изменения четко коррелировали со снижением ригидности клеточных мембран. Колебания упругости клеток отмечались и нашей группой при исследовании процесса



апоптоза нейтрофилов. Реализация апоптотической гибели клеток сопровождается периодическими колебаниями ригидности мембран. Перед отделением апоптотных телец ригидность клеток возрастала, после отделения — падала. В то же время некротическая гибель клеток сопровождается однонаправленным снижением ригидности мембран. Рост жесткости мембран является также неблагоприятным признаком, поскольку увеличение модуля Юнга мембран нейтрофилов зафиксировано группой профессора Д. Навайса (Navajas D., 2010) у больных хроническими обструктивными легочными заболеваниями.

Большую значимость имеют исследования, посвященные изучению механических свойств нейронов, так как нарушения морфологии основных клеток нервной системы, а также их механики, особенно в ростовых процессах, лежат в основе возникновения многих нейродегенеративных заболеваний. Показано, что при росте нейрона локальная микротвердость периферической зоны роста значительно превышает показатели центральной зоны (Xiong Y. et al., 2010). Интересная особенность отмечена и для церебральных эндотелиальных клеток. При долговременном исследовании ригидности мембраны одного и того же клеточного участка отмечается осцилляция показателей модуля Юнга, но все серии экспериментов свидетельствуют, что жесткость мембраны над ядерной областью на порядок ниже, чем на периферии клетки. Воздействие маннитола, который используется в медицинской практике для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, сопровождается не только уменьшением объема клеток, но и снижает ригидность клеточных мембран (Varo G. et al., 2010).

Доказано, что эластические свойства злокачественных трансформированных клеток значительно снижаются по сравнению с нормальными клетками той же ткани (Sokolov I., 2006). Одной из причин снижения ригидности является дефицит винкулина — мембран-ассоциированного белка, который играет роль в связывании элементов цитоскелета. Локальные механические свойства экстрацеллюлярного матрикса, механические свойства злокачественно трансформированных клеток, плотность экспрессии на них рецепторов фокальной адгезии напрямую влияют на возможность отделения клеток от общей массы опухоли, внедрение этих клеток в новое пространство и формирование очагов метастазирования (Ludvig T. et al., 2007). Клетки, пораженные малярией, также в значительной степени теряют свою эластичность.



У нормальных нативных клеток, в зависимости от типа тканей, от внеклеточного окружения, модуль Юнга варьирует от 0,5 до 200 кПа. Наибольшей корректностью отличаются эксперименты по замеру механических свойств изолированных клеток (например, клеток крови). Хотя недавно было показано, что жесткость мембран, измеренная на изолированных клетках и на клетках в составе тканей, не отличается на порядки, но, тем не менее, различия в показателях статистически значимы. Модуль Юнга изолированных эндотелиальных клеток аорты на подложке составил  $1,06 \pm 0,03$  кПа, а в составе нативной ткани —  $3,35 \pm 0,4$  кПа. Поскольку в значительной степени ригидность мембран обеспечивается целостностью элементов цитоскелета, достаточно широкое распространение получили модельные эксперименты, направленные на разрушение отдельных компонентов внутриклеточного матрикса. Оцениваются механические свойства клеток до и после такого воздействия. Опыты такого рода помогают определить, как цитоскелет влияет на форму клетки, на ее синтетическую активность и подвижность. На показатель ригидности клеточной мембраны очень сильно влияет также область клетки, на которую позиционируется зонд, например над ядром, над элементами цитоскелета и т. д. Поэтому интересным направлением исследования является сочетание конфокальной и атомно-силовой микроскопии для определения локальной ригидности клетки. При этом конфокальная микроскопия обеспечивает оптическую навигацию (окраска флуоресцентными красителями определенных элементов клеток), а атомно-силовая микроскопия — определение их ригидности (Berquand A. et al., 2010). Хотя сочетание атомно-силовой и конфокальной микроскопии может быть использовано и в другом порядке: АСМ осуществляет механическое воздействие на клетку, а конфокальная микроскопия выступает в качестве устройства, регистрирующего ответ клеток: например, возникновение кальциевой волны, перестройка элементов цитоскелета и т. д. (Guillaume T. et al., 2002). Незначительная модификация позволяет оценивать границы механической резистентности клеток. В частности, можно варьировать силу прижатия зонда к клетке в процессе спектроскопии либо варьировать силу прижатия пустого кантилевера для равномерного механического воздействия на клетку, а после этого вносить в среду постмортальный краситель (например, пропидиум йодид). Те клетки, которые не смогли скомпенсировать механическое давление, — погибли и их ядра будут окрашены пропидиумом йодидом. Это

окрашивание можно фиксировать, используя конфокальную или оптическую микроскопию (Adams E.L., Czymmek K.J., 2007; Pelling A. et al., 2007). В целом можно отметить, что чем больше микроскопических методов комбинируется при исследовании одного и того же объекта, тем более общую и многогранную картину свойств и особенностей этого объекта можно получить, а следовательно, и выводы будут обоснованными и объективными.

Принципиально иная модификация метода была использована Ж. Уэдером (Weder G. et al., 2009) для определения изменений сил адгезии клеток остеосаркомы к поверхности субстрата в течение клеточного цикла деления. Клетки синхронизировались в одной из фаз клеточного цикла:  $G_1$ ,  $S$  или  $G_2$ ,  $M$ . Для контроля использовались несинхронизированные клетки, после чего отдельная клетка высаживалась на кантилевер. Консоль медленно подводит клетку к поверхности подложки (стекла), слегка прижимала ее, после чего отводила. По силовой кривой определяли силу отрыва клетки от стекла, а по дискретным пикам количество и амплитуду адгезионных связей. Исследование в таком режиме продемонстрировало отсутствие различий между адгезионной активностью клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла. Однако перед этим было неоднократно отмечено, что как морфология, так и механические свойства клеток в процессе деления меняются существенно. Увеличение ригидности мембран клеток, вступающих в митотический цикл, сопровождается изменением плотности экспрессии адгезивных молекул. Авторы объяснили отсутствие достоверных различий между адгезией в разные периоды клеточного цикла слишком коротким временем контакта клетки с подложкой. Однако увеличение времени прижима клетки к стеклу вызывает достаточно прочную адгезию клеток не только на кантилевере, но и на стекле. Клетка прикрепляется столь прочно, что попытки отвода консоли от поверхности сопровождаются риском повреждения кантилевера. Скорее всего, дальнейшее совершенствование методики поможет окончательно определиться с ответом на вопрос: может ли меняться адгезия клеток при переходе из интерфазы в стадию митоза? Гораздо удачнее эта модификация метода была использована для оценки сил специфического взаимодействия. Если на поверхности подложки ковалентно фиксировать белки-адгезины (например, ICAM-1), а на кантилевере иммобилизовать клетку, способную к экспрессии специфических адгезинов, например лейкоциты, экспрессирующие LFA-1, то



можно моделировать адгезию, аналогичную той, что наблюдается *in vivo*. Именно такие эксперименты позволяют оценить плотность экспрессии адгезинов, их поляризацию на поверхности мембраны, оценить внеклеточные и внутриклеточные факторы, напрямую влияющие на адгезивную активность, а также установить взаимосвязь между механическими свойствами клетки и их влиянием на адгезионную активность. Например, установлено, что деадгезия (открепление) от субстрата сопровождается увеличением ригидности мембраны в 10 раз (Wojcikiewicz E.P. et al., 2003). Хороший практический выход имели аналогичные эксперименты, посвященные исследованию взаимодействия эстрадиола со специфическими эстрогенными рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Удачная модельная база позволила экспериментировать с дериватами эстрогенов (полиэстроген, парабен и т. д.), а также исследовать влияние на рецепцию агонистов и антагонистов (Elie-Caille C. et al., 2010).

Таким образом, резюмируя основные направления использования атомно-силовой микроскопии в исследовании эукариотических клеток, можно отметить, что главным образом метод используется в решении трех центральных задач:

- 1) получение изображения отдельных клеточных структур и самих клеток с высоким разрешением;
- 2) мониторинг динамических клеточных процессов в режиме реального времени;
- 3) определение микромеханических свойств живых клеток.

Метод атомно-силовой микроскопии в последнее время развивается очень уверенно, и те способы применения отдельных методик АСМ, которые пока апробируются на отдельных биологических системах, уже в ближайшей перспективе будут использованы для характеристики сложных закономерностей. Кроме того, сочетание отдельных приемов и режимов работы АСМ само по себе порождает принципиально новые направления. Благодаря тому, что в АСМ комбинируются:

- способность к получению изображений 3D с высоким разрешением;
- возможность исследования спектроскопических характеристик;
- способность менять конформацию биологических молекул и тут же отслеживать характеристики этих изменений;
- динамические наблюдения за биологическими объектами, только этот метод предоставляет достоверную информацию не только о том, как биологические молекулы выглядят, но и об их поведении в наномире.

Естественным процессом, наблюдающимся сейчас в области АСМ, является смещение акцента с использования метода только для получения наглядного изображения объектов (пусть и высококачественного) на использование зонда в качестве микроманипулятора. Именно эта методика позволяет открыть новые перспективы не только в области теоретической биологии, но и клинической практики. Конечно, каждое разделение является условным, но, тем не менее, отдельно обозначим самые перспективные модификации АСМ в биологических и медицинских исследованиях.



## 6.1. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

В патогенезе любой бактериальной инфекции инициирующим моментом является адгезия бактерий на поверхностях клеток-мишеней. Поэтому характер, число, расположение адгезинов являются характеристиками, непосредственно влияющими на эффективность адгезии, а следовательно, и на реализацию инфекционного процесса. Группа профессора Я.Ф. Дюфрэнэ (Dufrêne Y.F., Лувэн, Бельгия) установила, что по взаимодействию с зондом можно оценивать адгезивные свойства поверхностных белков и строить карты адгезии бактериальных клеток. Метод АСМ позволяет определить следующие характеристики:

- определить наличие и укладку основных адгезинов бактериальных клеток;
- для белков-адгезинов определить особенности развертки/свертки (folding/unfolding);
- оценить локализацию и плотность экспрессии основных адгезинов, что позволяет раскрыть патогенный потенциал бактериальных клеток;
- оказалось, что у бактериальных клеток есть «спрятанные» белки, которые «выныривают» на поверхность после механического давления на клетку. Force-induced adhesion domains можно получить на поверхности бактериальной клетки, если с должной силой воздействовать зондом на бактерию (рис. 6.1). Считается, что во время стресса бактериальные белки подвергаются гликозилированию и образуют стресс-индуцированные кластеры, которые носят название сенсосом. В данном случае зонд АСМ выступает в качестве и индуктора и детектора поверхностного механического стресса;
- связать механические свойства белка с местом локализации на поверхности бактериальной клетки;
- оценить резерв механической прочности бактериальной клетки. Это свойство важно для такой практической области медицины, как стерилизация, поскольку в расчете режимов автоклавирования (где сочетаются воздействия двух факторов: температуры и давления) знание о механических свойствах возбудителя является принципиальным.

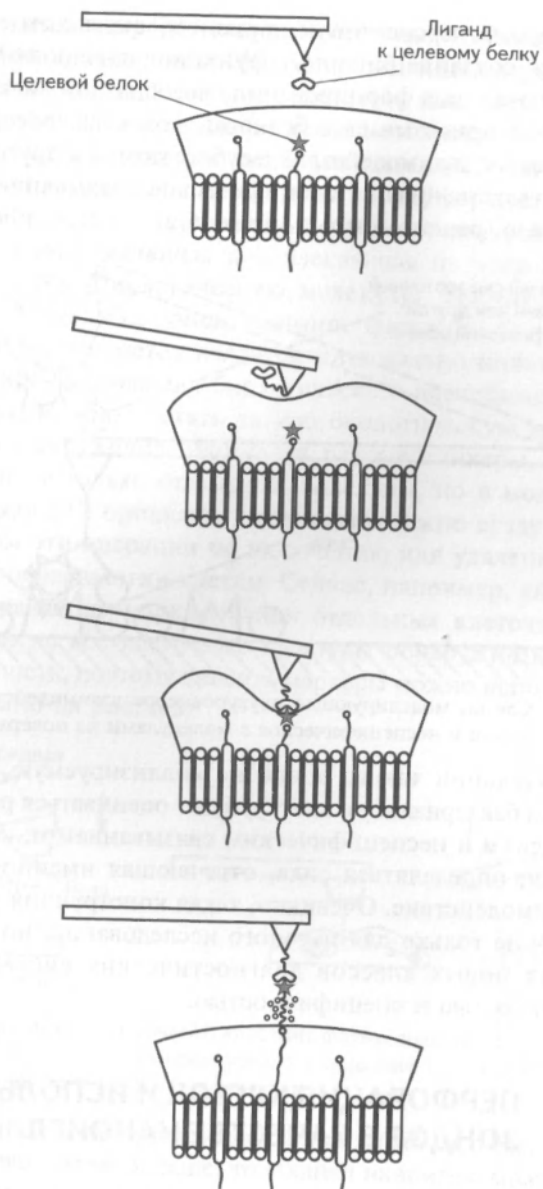
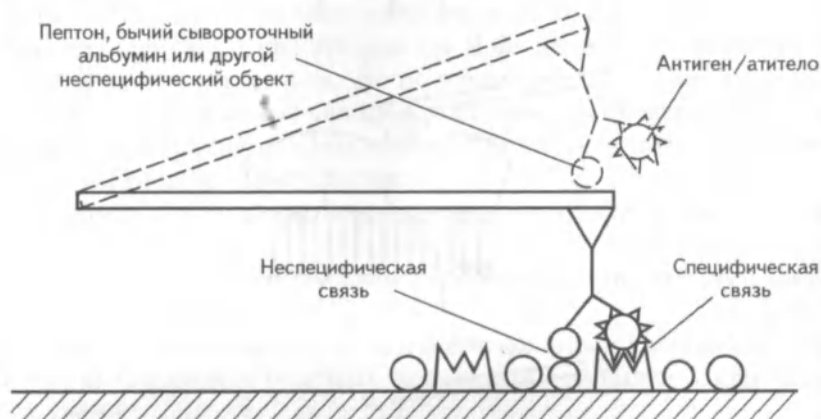


Рис. 6.1. Схема извлечения и специфического взаимодействия со «спрятанными» белками бактерий



Однако самым перспективным приемом, предлагаемым этой группой, является создание бинарных функционализированных зондов. Суть их заключается в формировании своеобразной вилки, к одному концу которой привязывается белковая молекула, обеспечивающая неспецифическое взаимодействие с субстратом, а к другому концу — молекула, ответственная за специфическое связывание (одна нить ДНК, антитело, рецептор и т. д.) (рис. 6.2).



**Рис. 6.2.** Схема, моделирующая двухуровневое взаимодействие (специфическое и неспецифическое с молекулами на поверхности)

При опускании такого зонда на анализируемую поверхность, например на бактериальную клетку, будет оцениваться разница между специфическим и неспецифическим связыванием и, исходя из этого различия, определяться сила, отвечающая именно за специфическое взаимодействие. Очевидно, такая конструкция является перспективной не только для научного исследования, но и для конструирования новых классов диагностических систем с высокой чувствительностью и специфичностью.

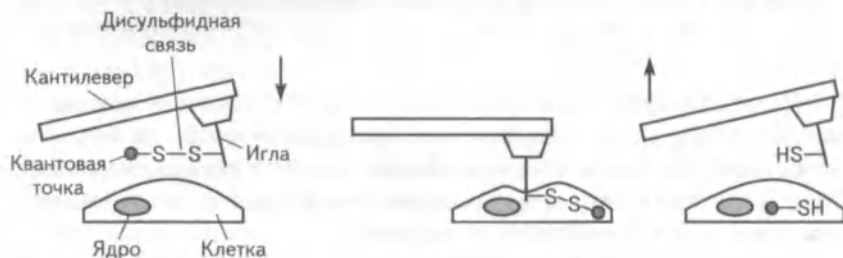
## 6.2. ПЕРФОРАЦИЯ КЛЕТОК И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗОНДОВ В КАЧЕСТВЕ НАНОИГЛ

Сначала биологические объекты сканировались исключительно в контактном режиме. Конечно, сейчас кажутся наивными утверждения, которые можно прочесть в ранних статьях по АСМ, о



том, что зонд не оказывает никаких негативных воздействий на сканируемый объект. Идеальной сферой применения сверхтонких зондов является его использование в качестве наноиглы, способной проткнуть клетку и «выудить» в клетке необходимую биологическую молекулу. Это занятие не менее увлекательно, чем зимняя рыбалка, когда коловратом (зондом) делается перфорация поверхности льда (мембраны) и в полученное отверстие запускается удочка (наноигла), обнаруживающая и извлекающая из реки (клетки) на поверхность рыбу (биологическую молекулу). Не случайно такая модификация метода получила название фишинга. Большим плюсом является то, что метод является минимально инвазивным. Он открывает широкое поле для биологического эксперимента.

Во-первых, можно достать любую биологическую молекулу из ее природного окружения, используя разные линкеры, во-вторых, можно внести не только отдельные молекулы, но и молекулярные ансамбли, и даже (!) органеллы, в-третьих, можно сразу отследить, каким образом эти операции по включению или удалению отражаются на морфофизиологии клетки. Сейчас, например, активно развивается направление маркирования отдельных клеточных структур, но далеко не все клеточные культуры обнаруживают фагоцитарную активность, поэтому вносить маркеры можно используя зонд, как это показано на рис. 6.3.

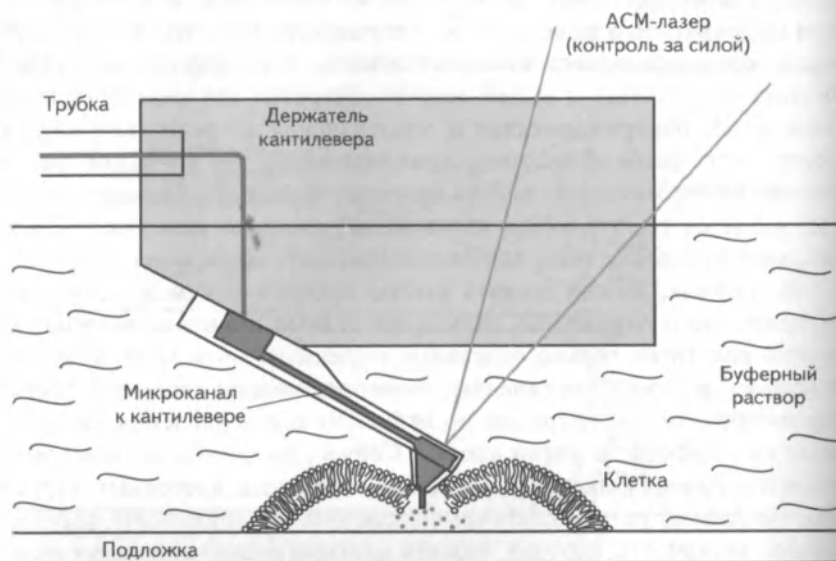


**Рис. 6.3.** Схема внутриклеточного внесения флуоресцентного маркера (квантовой точки) в цитоплазму клетки-мишени с использованием функционализированного зонда-иглы

Сейчас наиболее активно извлекаются мРНК и отдельные белки. Если развивать идею дальше, то в канал наноиглы можно ввести волновод, и тогда метод внутриклеточного исследования может быть аналогом эндоскопической хирургии: с помощью лазера «увидеть», допустим, поврежденную органеллу, а с помощью зонда-манипуля-



тора извлекаем ее. Модификацией метода является создание канальных зондов, в которых через ламинарный капилляр в клетку будут подаваться требуемые водорастворимые вещества (рис. 6.4).



**Рис. 6.4.** Схема введения в клетку водорастворимых веществ с использованием зонда в качестве наноиглы и кантилевера, модифицированного введением капилляра

Но зонд можно использовать не только в качестве наноманипулятора, но и в виде наноэлектрода: проводящая наноигла со сверхтонким изолирующим слоем полимера позволит исследовать электрохимические и сигнальные процессы, как во внутриклеточном пространстве, так и в межклеточной сети.

Нужно отметить, что конструирование наноигл является достаточно непростой задачей, поскольку, во-первых, при малом диаметре иглы (несколько нанометров) она должна быть достаточно длинной, чтобы обеспечить проникновение во внутреннюю среду клетки, во-вторых, при проникновении она не должна сломаться, что накладывает дополнительные конструкционные требования на материал, из которого наноиглы изготавливаются, в-третьих, он должен быть стабильным во внутриклеточной среде, в-четвертых, материал, из которого изготавливаются наноиглы, должен легко функ-

ционализироваться, т. е. обеспечивать прикрепление на поверхности разного рода молекул. Не менее строгие требования предъявляются и к сопровождающему оборудованию, в частности, проблема позиционирования наноиглы над конкретной клеткой-мишенью решается наличием пьезокерамических двигателей и оптической системы, которая должна не только отображать положение зонда с наноиглой над поверхностью клетки, но и детектировать глубину проникновения наноиглы в клетку-мишень (это можно сделать, используя электронную микроскопию). Хорошие результаты дает сочетание конфокальной и атомно-силовой микроскопии, поскольку с использованием разного рода флуоресцентных красителей можно вначале визуализировать целевой белок или целевую органеллу, а уже затем конкретно на нее позиционировать зонд.

### 6.3. КОНСТРУКТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЗОНДА

Для регистрации кинетических процессов, протекающих в клетке, чрезвычайно важно, насколько деликатно зонд клетки касается. Подводить зонд к поверхности живых клеток нужно как можно медленнее, чтобы не вызвать шок (P.D. Ashby). Идет активная переориентация на минимизацию воздействия зонда на биологический образец. Сейчас конструируются сканирующие системы, позволяющие отслеживать перемещения зонда в нанометровом диапазоне и воздействовать на образец с силой в несколько пиконьютон. Отрицательной чертой, с точки зрения наблюдения за живыми клетками, является их деформируемость под влиянием зонда. Дополнительные возмущающие силовые воздействия кантилевер оказывает в результате энтропийных колебаний, поскольку наблюдения за живыми клетками естественно проводятся при оптимальной для них температуре. В зависимости от типа клеток эта температура колеблется от 18 до 37 °C (а при исследовании эффектов гипертермии может быть поднята и выше), но в этом случае создается парадоксальная ситуация: температурные режимы благоприятны для живых объектов, но нежелательны для физической методики. Группой профессора П.Д. Эшби (Ashby P.D., Беркли, США) созданы специальные малые кантилеверы, которые значительно лимитируют деформируемость образца благодаря тому, что температурные шумовые воздействия оказываются сильно ограниченными. Это кантилеверы с



высокой резонансной частотой (0,6—1,2 МГц) и малой упругостью (0,2 Н/м). Внедрение таких зондов потребовало оптимизировать оптическую схему детекции, которая была бы сопоставима с минимальными отклонениями малых кантилеверов. Однако минимизация размеров кантилевера значительно ограничивает диапазон сканирования по оси  $z$ , делая их малопригодными для исследования эукариотических клеток, но не снижает их актуальности для исследования структуры и отдельных белков, и белок-нуклеиновых, и белок-белковых взаимодействий. Несомненным плюсом новых кантилеверов является точное позиционирование зонда, минимизация шума в высокопроводящей среде. Например, шум у созданного ими кантилевера  $\text{Ag}_2\text{Ga}$  с радиусом закругления кончика 81 нм составляет всего 6 пН/Гц. Еще одной конструкционной проблемой является диссипация света лазера в водной среде, поэтому высокая точность фокусировки является серьезной физической задачей. Для направленной фокусировки конструируют петлевые лазеры. По всем шумовым дефектам выстраивается карта флуктуаций, а после учета их вычитают из общих значений. Но самое оригинальное нововведение этой группы касается самих зондов, их конструируют мягкими, как щетки, поэтому они лишь слегка касаются поверхности исследуемых объектов (рис. 6.5). Авторы методики назвали такую модификацию метода «плужированием», однако с учетом мягкого касания клеток, скорее стоило бы назвать ее «поглаживанием». Если все предложенные модификации будут введены в действие, то полученная конструкция станет самой неразрушающей и щадящей. Дополнительным плюсом, который она даст, будет сохранение возможности наблюдения в контактном режиме, который позволит строить фрикционные карты клеток.

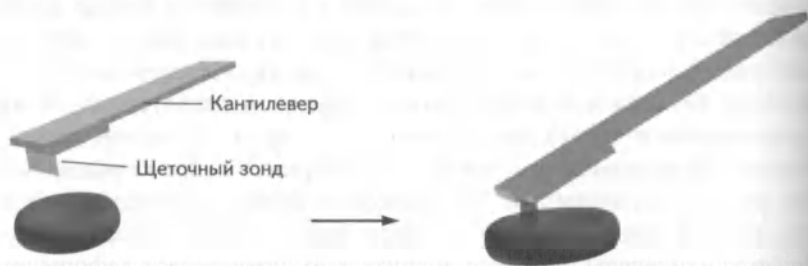


Рис. 6.5. Зонды в виде мягких щеточек, позволяющие минимизировать силу воздействия на клетки

Кроме традиционных, ставших уже привычными горизонтальных зондов уже сейчас предлагаются зонды принципиально иной конфигурации — вертикальные, и, безусловно, по мере преодоления проблем с установкой и работой детектирующих систем, которые пока не слишком хороши для работы в жидкости, они найдут свою нишу для применения. Эти зонды также многофункциональны. Во-первых, при проведении FS-спектроскопии получаемый результат ригидности мембран во многом зависит от геометрии зонда и от глубины проникновения зонда в клетку. В некоторых случаях не только зонд, но и кантилевер надавливают на клетку, что не может не отразиться на результатах измерения. В случае применения вертикальных зондов вопрос о шумовом воздействии кантилевера практически полностью снимается. Вертикальное расположение снижает и гидродинамическое давление, оказываемое горизонтальным зондом возможно не только на исследуемую клетку, но и на те клетки, которые находятся в непосредственной близости к исследуемой. Во-вторых, с помощью этих зондов можно исследовать и вязкоэластические свойства клеток и строить карты распределения сил трения. Но самой интересной особенностью вертикальных зондов оказалось то, что они способны в стационарном режиме (или, как называют его авторы, «пассивном») улавливать быстро рассеивающиеся мимолетно исчезающие волны, и это может легко детектироваться по флуктуационным смещениям зонда. Такие зонды позволяют оценивать поведение биологических молекул и их гидратных оболочек, а также целых клеток, фактически не прикасаясь к ним, т. е. не внося возмущающего эффекта. Такое бесконтактное исследование позволит максимально поддерживать нативность исследуемой биологической структуры. Медленно погружая зонд, можно снимать определенную томографию молекулярных слоев (рис. 6.6).

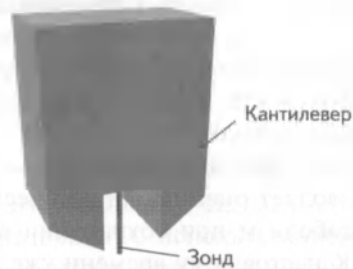


Рис. 6.6. Конструктивные особенности «вертикального» зонда и кантилевера



#### 6.4.

### ВЫСОКОСКОРОСТНАЯ АСМ-МИКРОСКОПИЯ

Благодаря АСМ мы получаем не только косвенную конечную информацию, которую предоставляет нам большинство биохимических методов, но и можем визуализировать процесс в каждый конкретный, интересующий нас интервал времени. Одной из самых перспективных методик, которая будет развиваться в ближайшем будущем, является высокоскоростная микроскопия (high-speed AFM). В этой методике сходятся три граничных условия:

- 1) динамику и кинетику биологических процессов нужно исследовать в физиологичной среде (жидкости);
- 2) разрешение должно быть высоким, чтобы можно было оценить структурные особенности исследуемых объектов;
- 3) исследование должно происходить очень быстро, чтобы успеть за клеточной или молекулярной кинетикой.

Поскольку все без исключения белки функционируют исключительно в водных растворах, которые и определяют конформацию белковых молекул, и способствуют реализации гидрофильно/гидрофобных взаимодействий, и являются ключевым фактором в реализации кинетических процессов, высокоскоростная АСМ-микроскопия в настоящее время является единственным методом, позволяющим вести и динамические, и кинетические наблюдения. В этом отношении и кристаллография, и спектроскопия, длительное время являющиеся лидерами при исследовании структурных характеристик белка, несомненно уступают АСМ. Еще одним вариантом рассмотрения белковых молекул является оптическая и электронная микроскопия, но электронная микроскопия не дает возможности исследования динамического поведения единичной молекулы, а оптическая не дает необходимой степени разрешения. Все методы, применяемые в оптической микроскопии для увеличения разрешения (например, использование флуоресцентных меток), автоматически переводят метод в разряд косвенных. При обычной скорости сканирования взаимодействие зонда и образца длится достаточно долго, что, во-первых, не позволяет учитывать слабых белок-белковых взаимодействий, а, во-вторых, может привести к прямому разрушению хрупких протеинов. Высокоскоростная микроскопия позволяет оценить динамическое поведение и функциональный метаболизм при сохранении слабых молекулярных взаимодействий. К настоящему времени уже активно изучается методом высокоско-

ростной АСМ-микроскопии активность молекулярных моторов (или, как их еще называют, «наномашин»), движение миозина по актину, индивидуальное поведение динеина и кинезина, фотоиндуцированные конформационные изменения бактериородопсина, открывание и закрывание ионных каналов, рост кристаллов, самосборка некоторых молекулярных ансамблей, ферментативный гидролиз целлюлозы. Для реализации высокой скорости сканирования обязательным является соблюдение трех граничных условий:

- 1) быстрый отклик обратной связи;
- 2) слабые силы взаимодействия между зондом и образцом;
- 3) система подавления механических вибраций кантилевера.

Большие преимущества имеет и одновременно подключаемый фазовый детектор, позволяющий параллельно получать фазово-контрастную картину. А для детализации образца всегда можно использовать обычную скорость сканирования. Уже сейчас высокоскоростная АСМ позволяет прописывать от 30 до 60 линий в секунду (при сканировании области порядка 25 нм). Проблемой в настоящее время является возможная смена настроек в ходе проведения высокоскоростной АСМ-микроскопии. Методом АСМ можно исследовать и процессы, запускаемые внешними стимулами, такими как изменение рН, температуры, добавление лигандов, механический стресс, свет. Скоростное сканирование ограничивают факторы:

- резонансная частота кантилевера;
- выравнивание с использованием среднеквадратичного коэффициента;
- ограничение области поднятия зонда по оси  $z$ .

Время, требуемое для получения одного изображения размером  $N \times N$  пикселей, описывается формулами

$$T > \frac{2nN^2}{F_c}; \quad (6.1)$$

$$T = \frac{2pN^2}{V_s} > \frac{2pN^2}{\lambda F_b}, \quad (6.2)$$

где  $T$  — время, затрачиваемое на получение изображения;  $n$  — минимальное число волн подводимого синусоидального сигнала, которое требуется для выравнивания (усреднения) с использованием среднеквадратичного коэффициента;  $F_c$  — резонансная частота кан-



тилевера;  $N$  — количество пикселей;  $p$  — размер пикселя;  $V_s$  — скорость сканирования образца в направлении  $x$ ;  $\lambda$  — латеральный размер объектов на исследуемой поверхности;  $F_b$  — скорость отклика обратной связи.

Поскольку  $F_b$  прямо пропорциональна высоте подъема кантилевера по оси  $z$ , становится понятным, почему при высокоскоростном сканировании ограничивается диапазон сканирования по вертикали. Но и это не все ограничения. Поскольку нужно работать в нативной для белка среде, кантилевер должен обладать высокой резонансной частотой и малой константой упругости, т. е. кантилевер должен иметь очень маленькие размеры. Детектирующая оптическая система должна иметь размеры, сопоставимые с таким маленьким кантилевером. Конвертер выравнивателя с использованием среднеквадратичного коэффициента должен вырабатывать амплитудное напряжение вводимого (немного деформируемого) синусоидального сигнала в течение одного периода осцилляции. Сканер должен двигаться очень быстро без нежелательных вибраций.

Развитие высокоскоростной АСМ-микроскопии позволит исследовать динамику любых, самых быстрых биологических процессов и сделает метод ведущим, даже по сравнению с конфокальной и многофотонной микроскопией.



## ПРИЛОЖЕНИЕ

### ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АСМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Атомно-силовая микроскопия является лишь одним из методов сканирующей зондовой микроскопии. Однако именно она оказалась самой востребованной в биологии и медицине.

Идея создания сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) принадлежит сотрудникам швейцарского отделения исследовательского центра фирмы IBM Ж. Биннингу и Х. Роепу (Binnig G., Rohrer H.). Они создали первый туннельный микроскоп. Туннельный эффект — квантовое явление проникновения микрочастицы из одной доступной области движения в другую, отделенную от первой потенциальным барьером. В 1981 г. был сконструирован первый прибор для проведения спектроскопических исследований участков поверхности. Принцип его работы заключался в том, что зонд подводили к исследуемой поверхности на очень близкое расстояние (доли ангстрема), подавали между зондом и образцом постоянное напряжение, вследствие чего между ними возникал туннельный ток. Его величина сильно зависела от промежутка зонд—образец и поддерживалась постоянной с помощью следящей системы, то опускающей, то поднимающей сканер в зависимости от рельефа исследуемой поверхности. Информацию об этом перемещении отслеживал компьютер, и после ее программной обработки можно было «увидеть» поверхность образца.

В конце 1983 г. началось изучение возможностей нового метода применительно к биологическим объектам — рассматривали ДНК на поверхности углеродной пленки. Эти работы были проделаны



Ж. Бинингом и Х. Роером совместно с Х. Гроссом (Gross H.). Первые сканирующие туннельные микроскопы работали в условиях вакуума при пониженных температурах, поэтому визуализировать можно было исключительно молекулярные объекты, и в то время сканирующая микроскопия еще не представляла того исключительного интереса для биологии, как сейчас. Однако эти прообразы современных микроскопов предоставляли огромные возможности физике поверхностных структур и явились немаловажным звеном в рождении нового направления исследовательских и практических работ — нанотехнологии. В 1984 г. появились сообщения об исследованиях при атмосферном давлении, в дистиллированной воде, в солевых растворах, а 1986 г. общепризнанно считается годом создания атомно-силового микроскопа.

Пионерские работы по использованию АСМ в биологии и медицине датируются декадой 1986—1996 гг. Однако полновесные работы, определившие преимущества АСМ перед другими микроскопическими методами и наметившие основные области применения, появляются только начиная с 1995 г. Конечно, самые ранние работы не были застрахованы от артефактов, которые сначала публиковались, а позднее публикации опровергались. Однако это явление не уникально и вполне объяснимо «ошибками взросления», поскольку любая микроскопия (в том числе электронная) в период зарождения не была свободна от ошибочных фактов и мнений. Но даже проблемы АСМ не могли уже остановить лавинообразного интереса к новому методу, поскольку он предлагал не только чрезвычайно высокий уровень разрешения (до нанометров), но и позволял манипулировать с отдельными молекулами, переставляя их, удаляя из клеток и проделывая массу других действий, которые были принципиально не доступны ни одному другому методу микроскопии. К тому же исследователей подкупала простота пробоподготовки для исследования образцов, которая состояла лишь из одного этапа — высаживания образца на подложку. Первоначально распространение метода частично сдерживалось недостаточным развитием сопровождающих систем: термостатируемых жидкостных ячеек, функционализированных зондов, оптимальной оптики и т. д. В настоящее время проблема адекватного оборудования является полностью разрешенной, а новые области применения АСМ ставят все новые, но вполне решаемые задачи перед производителями микроскопов и сопровождающих систем.

В 1991 г. появляется первая обзорная статья по использованию сканирующей зондовой микроскопии в биологии, написанная А. Энжелом (Engel A.). Она содержала всего 9 ссылок, но уже включала сведения о получении не только изображений статических биологических образцов, но и приводила результаты исследования динамических процессов. Интересным фактом для сравнения является то, что в отличие от первого обзора сегодняшние обобщающие работы приводят цитаты тысячи работ, поступающих из сотен различных лабораторий.

Безусловно, все первые работы касались исключительно исследований биологических образцов на воздухе. Этот этап был немаловажен для истории развития АСМ в биологии. Именно в это время отрабатываются такие важные для дальнейшего развития моменты, как процессы пробоподготовки, фиксации объектов, выбор оптимальных подложек, оптических систем для визуализации позиционирования зонда и создания качественного сигнала, апробированы различные моды сканирования. Основной практической задачей в исследовании образцов на воздухе являлось получение высокоразрешающего изображения для биологических молекул (ДНК, белка и т. д.).

Первый прорыв в изучении биологических систем отмечается в связи с внедрением жидкостных ячеек и возможностью получения изображений клеток в самой подходящей (физиологической) для них среде. Именно усложнение системы и шаг от единичных молекул к целой клетке ознаменовал прорыв в биомедицинском применении АСМ. Теперь становилось возможным рассматривать сложные биологические процессы в режиме реального времени, т. е. наблюдать за поглощением и выделением различных веществ из клеток, отслеживать отклики живых клеток на внешние воздействия, рассматривать процессы митоза и гибели клеток. Появилась возможность даже записывать фильмы о динамических процессах с недоступной ранее степенью разрешения! Практически одновременно с этим появляется вторая прорывная технология, связанная с переходом от контактного режима сканирования, способного привести к повреждению клеток к полуконтактному, простукивающему (tapping) режиму. Использование такой моды позволило минимизировать воздействие зонда на клетку, убирая латеральные силы взаимодействия между зондом и образцом, и, тем самым, предотвращало разрушение мягких биологических образцов. Логичным продолжением этих технологий стало возникновение высокоскоростной АСМ. Т. Андо и



П. Хансма (Ando T., Hansma P.) создали целые фильмы, доказывающие возможность исследования быстрых биологических процессов методом высокоскоростной АСМ-микроскопии. Таким образом можно изучать движение молекул, сборку надмолекулярных комплексов, рост кристаллов, открывание и закрывание кальциевых каналов, внутриклеточный транспорт и т. д. Оказалось, что можно использовать не только высокоскоростную микроскопию для получения изображений, но и высокоскоростную спектроскопию для исследования упруго-механических свойств поверхностей.

Если суммировать все вышеизложенное, то историю использования АСМ в биологии и медицине можно свести к следующим вехам:

- 1981 г. создание первого туннельного микроскопа — Binning G., Rohrer H.
- 1986 г. рождение атомно-силовой микроскопии — Binning G., Quate C.F., Gerber C.
- 1987 г. повышение разрешения за счет создания микроантилевера — Binning G. et al.
- 1989 г. доказана возможность исследования биологических объектов в жидкости и проведено первое исследование динамического биологического процесса методом АСМ — Drake B. et al.
- 1991 г. впервые получено изображение мембранных белков с молекулярным разрешением и впервые доказана возможность использования зонда в «нанохирургических операциях» по иссечению отдельных белков — Hoh J.H. et al.
- 1992 г. появление первых результатов по высокоскоростной АСМ-микроскопии, где на получение одного изображения затрачивалось порядка 10 с — Haberle W. et al.
- 1994 г. первое использование силовой спектроскопии для исследования сил взаимодействия между биологическими молекулами: двумя комплементарными цепями ДНК и двумя высокоаффинными молекулами авидина—стрептавидина — Lee G.U. et al. и оценка адгезионных сил в единичном лиганд-рецепторном контакте — Florin E.L.
- 1994 г. первое использование в воздушной среде полуконтактного режима сканирования — Anselmtti D. et al.

- 1994 г. получение высокоразрешающего изображения нанометрового диапазона в жидкой среде (токсина *Bordatella pertussis*, сорбированного на слюде) — Yang J. et al.
- 1995 г. высокоразрешающее изображение получено для единичных белков, связанных с мембраной в нативной среде — Schabert F.A. et al.
- 1995 г. внедрение нового направления — крио-АСМ, которое оказало неоценимую помощь при фиксации биомолекул к подложке и значительно уменьшило тепловое движение молекул, облегчая сканирование — Han W. et al.
- 1996 г. АСМ может детектировать и создавать карты распределения единичных молекулярных распознающих сайтов — Hinterdorfer P. et al.
- 1997 г. первая работа о возможности разворачивания белка (unfolding) с использованием зонда — Rief M. et al.
- 1999 г. использование динамической силовой спектроскопии — Merkel R. et al.
- 2000 г. стыковка методов АСМ-имиджинга и одномолекулярной спектроскопии для выделения из нативных мембран трансмембранных белков — Oesterhelt F. et al.
- 2000 г. исследование реологических свойств клеток благодаря изучению осцилляций зонда — Mahaffy R. et al.
- 2000 г. первое исследование взаимодействия между целостными клетками, одна из которых была зафиксирована на кантилевере, другая на подложке — Benoit M. et al.
- 2001 г. высокоскоростная АСМ-микроскопия достигает скорости 10 изображений в секунду при наблюдениях в буферных системах — Ando T. et al.
- 2003 г. исследование методом АСМ эластических свойств клеток и их изменения под воздействием разного рода биохимических стимулов — Wojcikiewicz E.R. et al.
- 2003 г. доказательство наличия сцепляющих связей между двумя белками при разрыве белок-белковых взаимодействий — Marshall B.T. et al.



- 2004 г. экспериментальное наблюдение за пенетрацией клеточной мембраны бактериальным токсином — Czajkowsky D.M. et al.
- 2004 г. динамическое наблюдение за сборкой на мембранах надмолекулярных комплексов, принимающих участие в процессе фотосинтеза — Scheuring S. et al.

Представленная здесь история использования разных модификаций метода АСМ наглядно демонстрирует активное развитие. Практически ежегодно появляются новые идеи по использованию метода в фундаментальных и прикладных направлениях, а также данные, которые не могут быть получены ни одной из существующих методик, кроме АСМ, и что также немаловажно в науке, данных, подтверждающих результаты, полученные другими методами. На наших глазах продолжается стремительное развитие использования АСМ в биологии и медицине и для исторического осмысления современного этапа необходимо, как минимум десятилетие.

Развитие метода АСМ в России тоже можно представить в виде основных вех:

- 1995 г. первая работа по исследованию ДНК методом АСМ и описанию процедуры фиксации молекулы — И.В. Тузовым, Е.В. Юрковой, Д.В. Клиновым, В.В. Деминым
- 1997 г. публикация первой книги под редакцией профессора И.В. Яминского «Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров», где суммируются работы его группы, посвященные исследованию методом АСМ не только единичных молекул (ДНК, белки) и надмолекулярных комплексов, но и бактериальных клеток
- 1999 г. первые исследования методом АСМ фиксированных эукариотических клеток (эритроцитов) — Т.Г. Матюшиной
- 2004 г. разработка метода FS-спектроскопии для оценки упругости мембран клеток группой профессора А.А. Бухараева
- 2004 г. получены изображения живых клеток в жидкостной ячейке (физиологичной среде) — С.Н. Плесковой, Ю.Ю. Гущиной, М.Б. Звонковой

Таким образом, воспринимаемая на начальном этапе развития лишь в качестве одного из методов высокоразрешающей микроскопии, сегодня АСМ решительно перешагнула эти отведенные для нее

рамки. Постоянно рождаются новые направления и идеи использования разнообразных модификаций метода в прикладных биологических, медицинских, биотехнологических исследованиях. Ежегодно проводятся конференции «AFM BioMed», резюмирующие эти новые направления. В России конференцией, в наибольшей степени захватывающей вопросы применения атомно-силовой микроскопии в медико-биологических исследованиях, является «Бионаноскопия», ежегодно проводимая в Москве.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной книге можно найти не только информацию об устройстве и принципе работы атомно-силового микроскопа, но и самостоятельно определиться с выбором режима сканирования, оптимального для вашей работы. Важным практическим выходом являются описания вариантов сканирования, которые применяются при различных биологических исследованиях. Суммируются уже полученные данные по биомедицинским АСМ-измерениям. Подробно рассматриваются методы фиксации биологических объектов на разных типах подложек.

Дается подробное описание преимуществ, которые дает метод атомно-силовой микроскопии в биологических и медицинских исследованиях. Важным моментом является рассмотрение конкретных результатов по определению морфологических и вязкоупругих характеристик биологических объектов на разном уровне организации живой материи: молекулярном (белки, ДНК, полисахариды и т. д.), клеточном (как в отношении прокариот, так и в отношении эукариот), тканевом.

Отдельная глава посвящена перспективам АСМ-методики, где рассматриваются те режимы и варианты сканирования, которые будут развиваться самыми быстрыми темпами. Уже сейчас атомно-силовая микроскопия является незаменимым методом исследования при определении целого ряда параметров биологических объектов, существенных для комплексной оценки биологических структур. Но вскоре этот инструмент, первоначально широко задействованный в развитии нанотехнологии, будет столь же широко использован в биологических и медицинских исследованиях, как сейчас оптические и электронно-микроскопические методы.



## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ПРИ ПОДГОТОВКЕ КНИГИ И РЕКОМЕНДУЕМЫХ ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

1. Adams E.L., Czymmek K.J. The combined application of AFM and LSCM: Changing the way we look at innate immunity. In: Modern Research and Educational Topics in Microscopy / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Diaz. Formatex, Spain, 2007. P. 68—76.

2. Ahimou F., Touhami A., Dufrene Y.F. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy // Yeast. V. 20, 2003. P. 25—30.

3. Ando T., Kodera N., Naito Y., Kinoshita T., Furuta K., Toyoshima Y.Y. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action // Chem. Phys. Chem. V. 4, 2003. P. 1196—1202.

4. Ando T., Kodera N., Takai E., Maruyama D., Saito K., Toda A. A high-speed atomic force microscope for studying biological macro-molecules // Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 98. USA, 2001. P. 12468—12472.

5. Antunes A., Gozzo F.V., Borella M.I., Nakamura M., Safatle A.M.V., Barros P.S.M., Toma H.E. Atomic Force Imaging of Ocular Tissues: morphological study of healthy and cataract lenses. In: Modern Research and Educational Topics in Microscopy / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Diaz. Formatex, Spain, 2007. P. 29—36.

6. Anselmetti D., Luthi R., Meyer E., Richmond T., Dreier M., Frommer J.E., Guntherodt H.-J. Attractive-mode imaging of biological materials with dynamic force microscopy // Nanotechnology. V. 5, 1994. P. 87—94.

7. Arnold M., Fritz M., Bäuerlein E., Radmacher M., Sackmann E., Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy // Physical review E: Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics. V. 62, 2000. P. 1034—1044.

8. Baclayon M., Wuite G.J.L., Roos W.H. Imaging and manipulation of single viruses by atomic force microscopy // Soft Matter. V. 6, 2010. P. 5273—5285.

9. Beckman M., Kolb H.-A., Lang F. Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis // The Journal of Membrane Biology. V. 140, 1994. P. 197—204.



10. Benoit M., Gabriel D., Gerisch G., Gaub H.E. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy // *Nature Cell Biology*. V. 2, 2000. P. 313—317.
11. Berdyeva T., Woodworth C.D., Sokolov I. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope // *Ultramicroscopy*. V. 102, 2005. P. 189—198.
12. Berquand A., Holloschi A., Trendelenburg M., Kioschis ?? Analysis of Cytoskeleton-Destabilizing Agents by Optimized Optical Navigation and AFM Force Measurement // *Microscopy Today*. V. 18, 2010. P. 34—37.
13. Binnig G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscope // *Physics Review Letters*. V. 56, 1986. P.930—933.
14. Bischoff G., Bernstein A., Wohlrab D., Hein H.-J. Imaging living chondrocyte surface structures with ACM contact mode In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 105—124.
15. Braet F., De Zanger R., Seynaeve C., Baekeland M., Wisse E. A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells // *Journal of Electron Microscopy*. V. 50, 2001. P. 283—290.
16. Braet F., Seynaeve C., De Zanger R., Wisse E. Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages // *Journal of Microscopy*. V. 190, 1997. P. 328—338.
17. Braga P. C., Ricci D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 42, 1998. P. 18—22.
18. Braga P.C., Ricci D. Imaging bacterial shape, surface and appendages before and after treatment with antibiotics. In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 179—188.
19. Braunstein D. Imaging an F-actin structure with noncontact scanning probe microscopy // *Journal of Vacuum. Science and Technology A*. V. 13, 1995. P. 1733—1736.
20. Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Ovchinnikov D.V. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by AFM // *Physics of Low-Dimension Structures*, 2003. P. 31—38.
21. Bushell G.R., Cahill C., Myhra S., Watson G.S. Analysis of human fibroblasts by atomic force microscopy In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 53—68.
22. Bustamante C., Vesenka J., Tang C.L. Rees W., Guthod M., Keller R. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy // *Biochemistry*. V. 31, 1992. P. 22—26.

23. Butt H.-J., Miller T., Gross H. Immobilizing biomolecules for scanning force microscopy by embedding in carbon // *Journal of Structural Biology*. V. 110, 1993. P. 127—132.
24. Butt H.J., Downing K.H., Hansma P.K. Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope // *Biophysics Journal*. V. 58, 1990. P. 1473—1480.
25. Chada V.G.R., Sanstad E.A., Wang R., Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces // *Journal of Bacteriology*. V. 185, 2003. P. 6255—6261.
26. Charras G.T., Horton M.A. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation // *Biophysical Journal*. V. 82, 2002. P. 2970—2981.
27. Ciancio A., Musetti R., Loi N. Atomic Force Microscopy of Unculturable Bacteria // *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*, 2004. P. 101—106.
28. Cisneros D.A., Hung C., Franz C.M., Muller D.J. Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy // *Journal of Structural Biology*. V. 154, 2006. P. 232—245.
29. Clemmer C.R., Beebe T.P. Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies // *Science*. V. 251, 1991. P. 640—642.
30. Crawford S.A., Higgins M.J., Mulvaney P., Wetherbee R. Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy // *Journal of Phycology*. V. 37, 2001. P. 543—554.
31. Czajkowsky D.M., Hotze E.M., Shao Z., Tweten R.K. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane // *EMBO Journal*. V. 23, 2004. P. 3206—3215.
32. Dalby M.J., Gadegaard N., Riehle M.O., Wilkinson Ch.D.W., Curtis A.S.G. Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. V. 36, 2004. P. 2005—2015.
33. Dalby M.J., Giannaras D., Riehle M.O., Gadegaard N., Affrossman S., Curtis A.S.G. Rapid fibroblast adhesion to 27 nm high polymer demixed nanotopography // *Biomaterials*. V. 25, 2004. P. 77—83.
34. Dame R.T., Wyman C., Goosen N. Analysis of Transcription and its Regulation by Scanning Force Microscopy // *Science, Technology and Education of Microscopy: an Overview*. V. 1, 2002. P. 588—596.
35. Deleu M., Paquot M., Jacques Ph., Thonart Ph., Adriaensen Y., Dufrière Y.F. Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidyl-choline monolayers // *Biophysics Journal*. V. 77, 1999. P. 2304—2310.
36. DeRose J.A., Revel J.-P. Studying the surface of soft materials (live cells) at high resolution by scanning probe microscopy: challenges faced // *Thin Solid Films*. V. 331, 1988. P. 194—202.
37. Doktycz M. J. *et al.* AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces // *Ultramicroscopy*. V. 97, 2003. P. 209—216.



38. Domke J., Parac W.J., George M., Gaub H.E. Radmacher M. Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscopy // *European Biophysics Journal*. V. 28, 1999. P. 179—186.
39. Drake B., Prater C.B., Weisenhorn A.L., Gould S.A., Albrecht T.R., Quate C.F., Cannell D.S., Hansma H.G., Hansma P.K. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope // *Science*. V. 243, 1989. P. 1586—1589.
40. Drygin Y.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy examination of tobacco mosaic virus and virion RNA // *FEBS Letters*. V. 425, 1998. P. 217—221.
41. Dubrovina E.V., Drygin Y.F., Novikov V.K., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. V. 3, 2007. P. 128—131.
42. Dubrovina E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S. The effect of underlying octadecylamine monolayer on the DNA conformation on the graphite surface // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V. 76, 2010. P. 63—69.
43. Dubrovina E.V., Staritsyn S.N., Yakovenko S.A., Yaminsky I.V. Self-Assembly Effect during the Adsorption of Polynucleotides on Stearic Acid Langmuir-Blodgett Monolayer // *Biomacromolecules*. V. 8, 2007. P. 2258—2261.
44. Dubrovina E.V., Voloshin A.G., Kraevsky S.V., Ignatyuk T.E., Abramchuk S.S., Yaminsky I.V., Ignatov S.G. Atomic Force Microscopy Investigation of Phage Infection of Bacteria // *Langmuir*. V. 24, 2008. P. 13068—13074.
45. Dufrêne Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstructed cell surface layers to living cells // *Micron*. V. 32, 2001. P. 153—165.
46. Dufrêne Y. F. Using nanotechniques to explore microbial surface // *Nature*. V. 2, 2004. P. 451—460.
47. Dufrêne Y.F., Boonaert C.J.P., Gerin P.A., Asther M., Rouxhet P.G. Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium* // *Journal of Bacteriology*. V. 181, 1999. P. 5350—5354.
48. Engel A. Biological applications of scanning probe microscopes // *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. V. 20, 1991. P. 79—108.
49. Florin E.L., Moy V.T., Gaub H.E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs // *Science*. V. 264, 1994. P. 415—417.
50. Florin E.L., Rief M., Lehmann H., Ludwig M., Dormair C., Moy V.T., Gaub H.E. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope // *Biosensors & Bioelectronics*. V. 10, 1995. P. 895—901.
51. Forsythe J.H., Maurice P.A., Hersman L.E. Attachment of a *Pseudomonas* sp. to Fe(III)-(hydr)oxide surfaces // *Geomicrobiology*. V. 15, 1998. P. 293—308.
52. Fritz J. et al. Translating biomolecular recognition into nano-mechanics // *Science*. V. 288, 2000. P. 316—318.
53. Fritz J., Anselmetti D. Probing Single Biomolecules with Atomic Force Microscopy // *Journal of Structural Biology*. V. 119, 1997. P. 165—171.

54. Fritz M., Radmacher M., Cleveland J.P., Allersma M.W., Stewart R.J., Gieselmann R., Janmay P., Schmidt C.F., Hansma P. Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solution with tapping mode atomic force microscopy // *Langmuir*. V. 11, 1995. P. 3529—3535.

55. Gad M., Ikai A. Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. // *Biophysical Journal*. V. 69, 1995. P. 2226—2233.

56. Grimaldi S., Girasole M., Cricenti A. Lymphoblastoid cells exposed to low-frequency magnetic fields In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 323—338.

57. Guillaume T., Horton M. Single Cell Mechanotransduction and its Modulation Analyzed by Atomic Force Microscope Indentation // *Biophysical Journal*. V. 82, 2002. P. 2970—2981.

58. Gunning A.P., Wilde P.J., Clark D.C., Morris V.J., Parker M.L., Gunning P.A. Atomic force microscopy of interfacial protein films // *Journal of colloid and interfacial science*. V. 183, 1996. P. 600—602.

59. Haberte W., Horber J.K., Ohnesorge F., Smith D.P., Binnig G. In situ investigations of single living cells infected by viruses // *Ultramicroscopy*. V. 42—44, 1992. P. 1161—1167.

60. Han W., Mou J., Sheng J., Yang J., Shao Z. Cryo atomic force microscopy: A new approach for biological imaging at high resolution // *Biochemistry*. V. 34, 1995. P. 8215—8220.

61. Hansma P.K., Elings V.B., Marti O., Bracker C.E. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology // *Science*. V. 242, 1988. P. 209—216.

62. Hassan E.A., Heinz W.F., Antonik M.D. et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy // *Biophysical Journal*. V. 74, 1998. P. 1564—1578.

63. Hegner M., Grange W., Bertoncini R. Measurement of single molecular interactions by dynamic force microscopy. In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 369—381.

64. Henderson R. M., Oberleithner H. Pushing, pulling, dragging, and vibrating renal epithelia by using atomic force microscopy // *AJP Renal physiology*, 2000. P. 689—701.

65. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J., Schilcher K., Schindler H. Detection and localization of individual antibody antigen recognition events by atomic force microscopy // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* V. 93, 1996. P. 3477—3481.

66. Hoh J.H., Lal R., John S.A., Revel J.P., Arnsdorf M.F. Atomic force microscopy and dissection of gap junctions // *Science*. V. 253, 1991. P. 1405—1408.



67. Hu J., Wang M., Weier H.-U.G., Frantz P., Kolbe W., Ogletree D.F. Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl)-triethoxysilane-mica by atomic force microscopy // *Langmuir*. V. 12 (7), 1996. P. 1697—1700.
68. Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria // *Biosensors & Bioelectronics*. V. 14, 1999. P. 599—624.
69. Jelen F., Vetterl V., Schaper A., Jovin T.M., Palacek E. Two-dimensional condensation of benzalkonium chloride at the mercury electrode and its relation to DNA imaging using scanning probe microscopy // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. V. 377, 1994. P. 197—203.
70. Kalinin S.V., Jesse S., Rodriguez B.J., Seal K., Baddorf A.P., Zhao T., Chu Y.H., Ramesh R., Eliseev E.A., Morozovska A.N., Mirman B., Karapetian E. Recent Advances in Electromechanical Imaging of the Nanometer Scale: Polarization Dynamics in Ferroelectrics, Biopolymers and Liquid Imaging // *Jpn. J. Appl. Phys.* V. 6, 2007. P. 5674—5685.
71. Kasas S., Ikai A. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging // *Biophysical Journal*. V. 68, 1995. P. 1678—1680.
72. Koksharov I.A., Sanin A.G., Guschina Yu.Yu., Zaslavskaja M.I., Pleskova S.N., Mironov A.A. Discreteness of erythrocyte membrane functional states: 2-fold transitions in response to an oxidative activation // *Proceedings of the Scanning Probe Microscopy, 2001. Workshop 26 February — 1 March 2001, Nizhny Novgorod, Russia*. P. 179—181.
73. Kuznetsov Yu.G., Daijogo S., Zhou J., Semler B.L., McPherson A. Atomic Force Microscopy Analysis of Icosahedral Virus RNA // *Journal of Molecular Biology*. V. 347, 2005. P. 41—52.
74. Kuznetsov Yu.G., McPherson A. Atomic force microscopy investigation of Turnip Yellow Mosaic Virus capsid disruption and RNA extrusion // *Virology*. V. 352, 2006. P. 329—337.
75. Kuznetsov Yu.G., Victoria J.G., Low A., Robinson W.E., Fan H., McPherson A. Atomic Force Microscopy Imaging of Retroviruses: Human Immunodeficiency Virus and Murine Leukemia Virus // *Scanning*. V. 26, 2004. P. 209—216.
76. Langer M.G., Fink St., Koitschev A., Rexhausen U., Hörber J.K.H., Ruppertsberg J.P. Lateral Mechanical Coupling of Stereocilia in Cochlear Hair Bundles // *Biophysical Journal*. V. 80, 2001. P. 2608—2621.
77. Lee G.U., Chrissey L.A., Colton R.J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA // *Science*. V. 266, 1994. P. 771—773.
78. Lee G.U., Kidwell D.A., Colton R.J. Sensing discrete Streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy // *Langmuir*. V. 10, 1994. P. 354—357.
79. Li M.Q. Scanning probe microscopy (STM/AFM) and applications in biology // *Applied Physics A: Materials Science & Processing*. V. 68, 1999. P. 255—258.

80. Lower K., Tadanier Ch.J., Hochella M.F. Dynamics of the Mineral—Microbe Interface: Use of Biological Force Microscopy in Biogeochemistry and Geomicrobiology // *Geomicrobiology Journal*. V. 18, 2001. P. 63—76.

81. Ludwig M., Dettmann W., Gaub H.E. Atomic Force Microscope Imaging Contrast Based on Molecular Recognition // *Biophysical Journal*. V. 72, 1997. P. 445—448.

82. Ludwig T., Kirmse R., Poole K. Challenges and Approaches — Probing Tumor Cell Invasion by Atomic Force Microscopy. In: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Diaz. Formatex, Spain. 2007. P. 11—22.

83. Lydataki S., Tsilimbaris M.K., Lesniewska E.S., Bron A., Pallikaris G. Corneal tissue observed by atomic force microscopy In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 69—83.

84. Lyubchenko Yu., Shlyakhtenko L., Harrington R., Odent P., Lindsay S. Atomic force microscopy of long DNA: Imaging in air and under water // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. V. 90, 1993. P. 2137—2140.

85. Mahaffy R., Shih C., MacKintosh F., Kas J. Scanning probe based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells // *Physical Review Letters*. V. 85, 2000. P. 880—883.

86. Malkin A.J., McPherson A., Gershon P.D. Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Visualized by In Situ Atomic Force Microscopy // *Journal of Virology*. V. 77, 2003. P. 6332—6340.

87. Malkin A.J., Plomp M., McPherson A. Unraveling the Architecture of Viruses by High-Resolution Atomic Force Microscopy. From: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, N.J. V. 292, 2005. P. 85—108.

88. Marshall B.T., Long M., Piper J.W., Yago T., McEver R.P., Zhu C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules // *Nature*. V. 423, 2003. P. 190—193.

89. Martinkina L. P., Klinov D.V., Demin V.V., Vengerov Yu.Yu. Application of electron microscopy and atomic force microscopy techniques to the ultrastructural studies of DNA complexes with synthetic oligopeptide // *Science, Technology and Education of Microscopy: an Overview*. V. 1, 2006. P. 476—482.

90. Mateiu R. et al. An approach to a multi-walled carbon nanotube based mass sensor // *Microelectronic Engineering*. V. 3, 2004. P. 5—10.

91. Merkel R., Nassoy P., Leung A., Ritchie K., Evans E. Energy landscapes of receptor—ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy // *Nature*. V. 397, 1999. P. 50—53.

92. Miyazaki H., Hayashi K. Measurement of Mechanical Properties of Intact Endothelial Cells in Fresh Arteries. In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press Inc., Totowa NJ. 2003. P. 307—313.





93. Moloney M., McDonnell L., O'Shea H. Immobilisation of Semliki forest virus for atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. V. 91, 2002. P. 275—279.
94. Müller D.J., Amrein M., Engel A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy // *Journal of Structural Biology*. V. 119, 1997. P. 172—188.
95. Müller D.J., Baumeister W., Engel A. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy // *Journal of Bacteriology*. V. 178, 1996. P. 3025—3030.
96. Müller D.J., Engel A. Voltage and pH-induced channel closure of porin Omp F visualized by atomic force microscopy // *Journal of Molecular Biology*. V. 285, 1999. P. 1347—1351.
97. Nag K., Harbottle R.R., Panda A.K., Petersen N.O. Atomic-force microscopy of interfacial monomolecular films of pulmonary surfactant. In: *Methods in molecular biology*. Vol. 242: Atomic force microscopy: Biomedical methods and application / Eds. P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, Inc. in Totowa, NJ, US (United States), 2003. P. 231—243.
98. Obratsova E.A., Kalinina N.O., Taliany M.E., Gabrenaitė-Verkhovskaya R., Makinen K., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy of Potato Virus A // *Colloid Journal*. V. 70, 2008. P. 199—201.
99. Parot P., Dufrenoy Y.F., Hinderdorfer P., Le Grimelec Ch., Navajas D., Pellequer J.-L., Scheuring S. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine // *Journal of molecular recognition*. V. 20, 2007. P. 418—431.
100. Pelling A.E., Nicholls B.M., Silberberg Y.R., Horton M.A. Approaches for Investigating Mechanobiological Dynamics in Living Cells with Fluorescence and Atomic Force Microscopies. In: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Diaz. Formatex, Spain. 2007. P. 29—36.
101. Putman C.A.J., Van der Welf K.O., De Grooth B.G., Van Hulst N.F., Greve J. Tapping mode atomic force microscopy in liquid // *Applied Physics Letters*. V. 64, 1994. P. 2454—2456.
102. Reutter B., Checco A., Cai Yu., Gang O., Ocko B.M. Using non-contact AFM to image liquid topographies. [www.agilent.com](http://www.agilent.com)
103. Rief M., Gautel M., Oesterhelt F., Fernandez J.M., Gaub H.E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM // *Science*. V. 276, 1997. P. 1109—1112.
104. Rogers B., York D., Whisman N., Jones M., Murray K., Adams J.D. Tapping mode atomic force microscopy in liquid with an insulated piezoelectric microactuator // *Review of scientific instruments*. V. 73, 2002. P. 3242—3244.
105. Rotsch Ch., Braet F., Wisse E., Radmacher M. AFM Imaging and Elasticity Measurements on Living Rat Liver Macrophages // *Cell Biology International*. V. 21, 1997. P. 685—696.



106. S.-Paulo A., Garcia R. High-Resolution Imaging of Antibodies by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy: Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes // *Biophysical Journal*. V. 78, 2000. P. 1599—1605.
107. Schabert F.A., Henn C., Engel A. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy // *Science*. V. 268, 1995. P. 92—94.
108. Schaer-Zammaretti R., Ubbink J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM — elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data // *Ultramicroscopy*. V. 97, 2003. P. 199—208.
109. Schaper A., Starink J.P.P., Jovin T.M. The scanning probe microscopy of DNA in air and in n-propanol using new spreading agents // *FEBS Letters*. V. 335, 1994. P. 91—95.
110. Schaus S.S., Henderson E.R. Cell viability and probe-cell membrane interaction of XR1 glial cells imaged by atomic force microscopy // *Biophysics Journal*. V. 73, 1997. P. 1205.
111. Scheuring S., Sturgis J.N., Prima V., Bernadac A., Levy D., Rigaud J.L. Watching the photosynthetic apparatus in native membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 101, 2004. P. 11293—11297.
112. Seizo M. Roadmap of Scanning Probe Microscopy. *NanoScience and Technology*, 2007. P. 201.
113. Tomankova K., Kolarova H., Vujtek M., Zapletalova H. Study of Cancer Cells Used Atomic Force Microscopy. In: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Díaz. Formatex, Spain. 2007. P. 23—28.
114. Tamayo J., Humphris A.D.L., Owen R.J., Miles M.J. High-Q Dynamic Force Microscopy in Liquid and its Application to Living Cells // *Biophysical Journal*. V. 81, 2001. P. 526—537.
115. Thurner P.J., Oroudjev E., Jungmann R., Kreutz C., Kindt J.H., Schitter G., Okounova T.O., Lauer M.E., Fantner G.E., Hansma H.G., Hansma P.K. Imaging of Bone Ultrastructure using Atomic Force Microscopy. In: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* / Eds. A. Méndez-Vilas, J. Díaz. Formatex, Spain. 2007. P. 37—48.
116. Touhami A., Nysten B., Dufrene Y.F. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy // *Langmuir*. V. 19, 2003. P. 4539—4543.
117. Van Der Aa B.C. et al. Stretching cell surface macromolecules by atomic force microscopy // *Langmuir*. V. 17, 2001. P. 3116—3119.
118. Weder G., Vörös J., Giazon M., Matthey N., Heinzelmann H., Liley M. Measuring cell adhesion forces during the cell cycle by force spectroscopy Biointerphases. V. 4, 2009. P. 27—34.
119. Weisenhorn A.L., Drake B., Prater C.B., Gould S.A.C., Hansma P.K., Ohnesorge F., Egger M., Heyn S.-P., Gaub H.E. Immobilized proteins in buffer solution at molecular resolution by atomic force microscopy // *Biophysics Journal*. V. 58, 1990. P. 1251—1258.



120. Willemsen O.H., Snel M.M.E., van der Werf K.O., de Grooth B.G., Greve J., Hinterdorfer P., Gruber H.J., Schindler H., van Kooyk Y., Figdor C.G. Simultaneous Height and Adhesion Imaging of Antibody-Antigen Interactions by Atomic Force Microscopy // *Biophysics Journal*. V. 75 (5), 1998. P. 2220—2228.
121. Wojcikiewicz E.P., Zhang X., Chen A., Moy V.T. Contributions of molecular binding events and cellular compliance to the modulation of leukocyte adhesion // *Journal of Cell Science*. V. 116, 2003. P. 2531—2539.
122. Wolf F., Geley S. A simple and stable autofocusing protocol for long multidimensional live cell microscopy // *Journal of Microscopy*. V. 221 (1), 2005. P. 72—77.
123. Xing H., Yu L. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects // *Methods in Cell Science*. V. 21, 1999. P. 1—17.
124. Xu W., Mulhern P.J., Blackford B.L., Jericho M.H., Firtel M., Beveridge T.J. Modeling and measuring the elastic properties of an archaeal surface, the sheath of *Methanospirillum hungatei*, and the implication for methane production // *Journal of Bacteriology*. V. 178. 1996. P. 3106—3112.
125. Yang J., Mou J., Shao Z. Structure and stability of pertussis toxin studied by in situ atomic force microscopy // *FEBS Letters*. V. 338, 1994. P. 89—92.
126. Yao X., Jericho M., Pink D., Beveridge T. Thickness and elasticity of Gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy // *Journal of Bacteriology*. V. 181, 1999. P. 6865—6875.
127. Yao X., Waltera J., Burkea S., Stewart S., Jericho M.H., Pink D., Hunter R., Beveridge T.J. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. V. 23, 2002. P. 213—230.
128. Zhang B., Xu G., Evans J.S. A kinetic molecular model of the reversible unfolding and refolding of titin under force extension // *Biophysical Journal*. V. 77, 1999. P. 1306—1315.
129. Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy // *Surface Science Letters*. V. 290, 1993. P. 688—692.
130. Бессмельцева Е.В., Зайцев Б.Н., Гилева И.П., Рябчикова Е.И. Изучение морфологии клеток *E. coli* — продуцентов рекомбинантных белков с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии // *Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования*. № 7, 2003. С. 39—42.
131. Боровик А.С., Тарасова О.С., Большакова А.В., Яминский И.В. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения живых клеток // *Успехи современной биологии*. Т. 120. № 2, 2000. С. 217—224.
132. Галямов М.О., Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот. М.: Изд-во центра перспективных технологий, 1998. 19 с.

133. Гущина Ю.Ю., Плохов Р.А., Зевеке А.В. Исследование влияния обводнения рН и модуляторов протеогликанов на морфологию фибрилл и субволокон коллаген // Вестник Нижегородского государственного университета. № 1, 2007. С. 114—118.

134. Зайцев Б.Н., Дурманов А.Г., Бакулина Л.Ф., Генералов В.М. Исследование взаимодействия эритроцитов и вирусных частиц методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования. № 7, 2003. С. 34—38.

135. Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа // Письма в ЖТФ. Т. 35, 2009. С. 235—237.

136. Лиманский А.П. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи современной биологии. Т. 123, 2003. С. 531—542.

137. Матюхина Т.Г. Исследование эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии // Клиническая лабораторная диагностика. № 6, 1999. С. 13—16.

138. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб. пособие для студ. старших курсов вузов. Н. Новгород: РАН Институт физики микроструктур, 2004. 114 с.

139. Саватеев Н.М. Протоколы приготовления образцов молекул ДНК для измерения методом АСМ. <http://www.ntmdt.ru>

140. Филатов Д.О., Круглов А.В., Гущина Ю.Ю. Исследование топографии поверхности твердых тел методом атомно-силовой микроскопии в контактном режиме. Н. Новгород: НИОЦ СЗМ Нижегородского государственного университета, 1999. 34 с.

141. Филатов Д.О., Круглов А.В., Гущина Ю.Ю. Исследование топографии поверхности твердых тел методом атомно-силовой микроскопии в неконтактном режиме. Н. Новгород: Нижегородский государственный университет, 2003. 23 с.

142. Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М.: Научный мир, 1997. 88 с.

143. Яминский И.В., Демин В.В., Бондаренко В.М. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих *rfb* а 3,4 ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиологии. № 6, 1997. С. 15—18.

**Учебное издание**

Заявки на книги присылайте по адресам:

**zakaz@id-intellect.ru**

**solo@id-intellect.ru**

**id-intellect@mail.ru**

тел. (495) 579-96-45

факс (495) 617-41-88

В заявке обязательно указывайте  
свои реквизиты (для организаций) и почтовый адрес!

Подробная информация о книгах на сайте

**<http://www.id-intellect.ru>**

**Светлана Николаевна Плескова**

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Компьютерная верстка – Н.А. Попова

Корректор – Г.Н. Петрова

Художник – С.Ю. Биричев

Ответственный за выпуск – Л.Ф. Соловейчик

---

Формат 60х90/16. Печать офсетная.

Гарнитура Ньютон.

Печ. л. 11,5. Тираж 800 экз. Зак. № 1103

Бумага офсетная № 1, плотность 80 г/м<sup>2</sup>

---

Издательский Дом «Интеллект»

141700, Московская обл., г. Долгопрудный,

Промышленный пр-д, д. 14,

тел. (495) 617-41-85

---

Отпечатано в ООО «Чебоксарская типография № 1»

428019, г. Чебоксары, пр-т И. Яковлева, д. 15